

**Untersuchungen zur Frage
der Verträglichkeit und Immunogenität
der neuen PCEC-Tollwutvakzine beim Menschen**

Jürgen Baer

Aus dem Institut für Medizinische Virologie und Immunologie
(Direktor: Prof. Dr.Dr.med. Ernst Kuwert[†],
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr.med. N. Scheiermann)
Universitätsklinikum Essen

vorgelegt über

das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. mult. A. Mayr)

Untersuchungen zur Frage der Verträglichkeit und
Immunogenität der neuen PCEC-Tollwutvakzine beim Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Jürgen Baer
aus Bochum

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. W. Ahne

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

"PASTEUR entretiendra avec le petit Alsacien une correspondance affectueuse et paternelle. Il suivra l'évolution de sa santé avec une grande attention. JOSEPH MEISTER sera par la suite engagé à l'Institut Pasteur en qualité de gardien et ce, jusqu'en mars 1940, date à laquelle il se suicidera lors de l'entrée des Allemands a Paris."

ROSSET, 1985 (111)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Abkürzungen und Definitionen	5
------------------------------------	---

I. EINLEITUNG	9
---------------------	---

II. LITERATUR

A. Ätiologie der Tollwut - Das Tollwutvirus	12
B. Pathogenese und Klinik der Tollwuterkrankung	24
C. Lokale Maßnahmen nach Tollwutexposition und passive Immunisierung	29
D. Tollwutimpfstoffe aus Gehirngewebe adulter Tiere	32
E. Enteneivakzine und Impfstoffe aus Gewebekulturen	36

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Vakzine, Probanden, Material und Methoden	
1. Vakzine	46
2. Probanden, Impfungen und Blutentnahmen	46
3. Erfassung der Reaktogenität	
3.1 Fragebogenaktion	47
3.3 Radio Allergo Sorbens Test	47
4. Erfassung der Immunogenität	
4.1 Komplementbindungsreaktion	49
4.2 Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test	54
5. Untersuchung der Probandenseren auf Interferon	59
6. Statistische Berechnungen	61
B. Ergebnisse	
1. Reaktogenität	
1.1 Fragebogenaktion	62
1.2 Nachweis von Serum-IgE-Antikörpern gegen Hühner-eiweiß	65

2. Immunogenität	
2.1 Kinetik der Antikörper- bildung	66
2.2 Antikörperbildung unter Be- rücksichtigung verschiedener Impfschemata	68
2.3 Bedeutung der Impfung am Tag 3	79
2.4 Bedeutung der Impfung am Tag 90	84
3. Interferoninduktion	86
C. Diskussion	
1. Reaktogenität	91
2. Immunogenität	94
3. Interferoninduktion	100
IV. ZUSAMMENFASSUNG	103
V. SUMMARY	105
VI. TABELLARISCHER ANHANG	107
VII. LITERATURVERZEICHNIS	123

Abkürzungen und Definitionen

Ag	Antigen
Ag-Ak-Reaktion	Antigen-Antikörper-Reaktion
Ak (Akk)	Antikörper
Antigen-C'H ₅₀	diejenige Antigenmenge, bei der 50 % der im Reaktionsansatz vorhandenen sensibilisierten Schaferythrozyten lysiert werden;
Antikörper-C'H ₅₀	diejenige Serumverdünnung, bei der 50 % der im Reaktionsansatz vorhandenen sensibilisierten Schaferythrozyten lysiert werden;
AMV	Aviäres Myeloblastose Virus
BHK	Babyhamsternierenzellen
CEC	Chick Embryo Cell
C'H ₅₀	die zur Erreichung einer 50%igen Hämolyse notwendige Menge an Komplement
CPE	cytopathischer Effekt
CVS	Challenge Virus Standard
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DEV	Duck Embryo Vaccine
DKC	Dog Kidney Cell
(ds)c-DNA	(doppelstrangige) Komplementär-Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMC-Virus	Encephalomyocarditis-Virus
ERA	Tollwutvirusstamm, Variante des SAD-Stammes
FA-Technik	Fluoreszierende Antikörper-Technik
FCKC	Foetal Calf Kidney Cell
FFD ₅₀	mittlere (50 %) fluoreszierende Foci Dosis
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flury	Virus fixe-Stamm
GM 2504	Fibroblasten-Zellstamm vom Menschen
GMT	geometrisches Titermittel
HAU	hämagglutinierende Einheit
HDCS (V)	Human Diploid Cell Strain(-Vakzine)
HEP	High Egg Passage
HH-Akk	hämagglutinationshemmende Antikörper

HHT	Hämagglutinationshemmungstest
HKC	Hamster Kidney Cell
ID ₅₀	50 % infektiöse Dosis
IF	Interferon
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
i.c.	intracerebral
i.m.	intramuskulär
IRP	International Reference Preparation
IU	International Unit (internationale Einheit)
kb. Akk	komplementbindende Antikörper
KBR	Komplementbindungsreaktion
LD ₅₀	50 % letale Dosis
LEP	Low Egg Passage
MNT	Mäuseneutralisationstest
MRC	Medical Research Council
m-RNA	Messenger-Ribonucleinsäure
n	Anzahl
ND ₅₀	50 % virusneutralisierende Dosis
NIH	National Institutes of Health
n.s.	nicht signifikant
o.D.	gemessene Extinktion (optische Dichte)
PBS	Phosphate Buffered Sodiumchloride (Phosphat- gepufferte Natriumchlorid-Lösung)
PCEC(V)	Purified Chick Embryo Cell (-Vakzine)
PFU	plaquebildende Einheit
PM	Pitman Moore-Tollwutvirusstamm
PVR(V)	Purified Vero Rabies (-Vakzine)
RAST	Radio Allergo Sorbens Test
RFFIT	Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test
RIGH	Rabies Immune Globulin of Human Origin
RNA	Ribonucleinsäure
s	Standardabweichung
S	SVEDBERG-Einheit
SAD	Street Alabama Dufferin-Tollwutvirusstamm
SFV	Semliki Forest Virus
SPE	spezifiziert pathogenfrei
SVC	Spring Viremia of Carp

T-Lymphozyt	thymusabhängiger Lymphozyt
TW (V)	Tollwut (virus)
VB	Variationsbreite
VHS-Virus	Virus der hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle
VN-Akk	virusneutralisierende Antikörper
V-RG-Virus	Vaccinia-Rabiesglykoprotein-rekombiniertes Virus
WHO	World Health Organization
WS-3	Wutschutz 3, nationaler deutscher Antitollwut-Serumstandard
ZNS	Zentralnervensystem

I. EINLEITUNG

Für die Tollwuterkrankung gilt nach wie vor, was OVID (43 v.Chr. - 17 n.Chr.) formulierte: "Tollere nodasam nescit medicina podagram nec formidatis axiliatur aquis" - die Medizin vermag weder die Gicht zu heilen noch bei der Wasserscheu (Hydrophobie = Tollwut) zu helfen (89). Es gibt keine erfolversprechende Behandlung der klinisch manifesten Tollwut. Für den kurativ Handelnden besteht wegen der besonderen Pathogenese dieser Erkrankung jedoch die Möglichkeit, durch aktive oder kombinierte aktiv/passive Immunisierung frühzeitig nach Viruskontakt (Exposition) den Ausbruch der Erkrankung beim Menschen zu verhindern.

Auf dem präventiv-medizinischen Gebiet dieser "post-expositionellen Tollwutprophylaxe" herrscht ein Jahrhundert nach der ersten Tollwutimpfung eines Menschen durch LOUIS PASTEUR am 7. Juli 1885 weltweit eine ausgesprochen widersprüchliche Situation. Einerseits steht in den Ländern mit vergleichsweise geringer Gefährdung des Menschen durch die hier vorherrschende silvatische Form der Tollwut, im wesentlichen Europa und Nordamerika, mit der Human Diploid Cell Strain-(HDCS-)Tollwutgewebekulturvakzine eine 'vaccine de luxe' mit hoher Antigenität und Schutzkraft bei gleichzeitigem Fehlen relevanter Nebenwirkungen zur Verfügung (75). Die Anwendung dieses Impfstoffes wird zwar durch keinerlei Neurokomplikationen belastet, ihr aufgrund schwieriger Produktionsbedingungen hoher Preis (in der Bundesrepublik Deutschland zur Zeit (1986) 105,60 DM je Dosis) führt jedoch dazu, daß der Einsatz der HDCS-Vakzine in den meisten Regionen der Welt die finanziellen Möglichkeiten der dortigen Gesundheitssysteme bei weitem übersteigt (112).

Deshalb kommen andererseits in Ländern, in denen die Tollwut in ihrer durch streunende Hunde und Katzen übertragenen, urbanen Form eine erhebliche Gefährdung des Menschen darstellt, fast ausschließlich die letztlich noch auf PASTEUR zurückgehenden, durch hohe Neurokomplikationsraten und geringe virusspezifische Antigenität charakterisierten Impfstoffe aus Gehirngewebe zur Anwendung. SEHGAL und GUPTA nannten 1985 allein für Indien die Zahl von 40 Millionen Dosen einer 5%igen inaktivierten Gehirngewebevaccine, die dort jährlich zur post-expositionellen Tollwutprophylaxe eingesetzt werden (124).

Ein Ausweg aus dieser Situation ist die Entwicklung anderer Tollwutgewebekulturvakzinen, die auf Zellkultursystemen produziert werden, die größere Produktionsraten zulassen und deshalb zu einem preiswerteren Produkt führen, gleichzeitig aber die hohen Maßstäbe des HDGS-Impfstoffes hinsichtlich Reaktogenität und Wirksamkeit so weit wie möglich erreichen. Die Behringwerke AG, Marburg stellten 1984 eine neue Tollwutgewebekulturvaccine vor, den Purified Chick Embryo Cell-(PCEC-)Tollwutimpfstoff, der als inaktivierte Vaccine durch den auf primären Hühnerembryofibroblastenkulturen gezüchteten Tollwutvirusstamm Flury LEP-C 25 und Reinigung und Konzentration mittels kontinuierlicher Dichtegradientenultrazentrifugation charakterisiert ist (16,17).

An 88 freiwilligen Probanden wurde 1985 in München und Essen eine Impfstudie zur klinischen Prüfung dieses neuen PCEC-Impfstoffes durchgeführt. Dabei sollten Reaktogenität, Immunogenität und die Fähigkeit zur Interferoninduktion des zu prüfenden Produktes ermittelt werden. Die Immunogenität wurde als Induktion virusneutralisierender Serumantikörper erfaßt. Daneben sollte durch Anwendung verschiedener Applikationsschemata geprüft werden, ob die ursprünglich für den HDGS-Impfstoff

entwickelten prä- und post-expositionellen Impfschemata (69) auch für die PCEC-Vakzine empfohlen werden können.

In dieser Arbeit sollen zunächst, aus heutiger Sicht, die wichtigsten Eigenschaften des Tollwutvirus, die oben angesprochenen Besonderheiten der Tollwutpathogenese und die für die Bundesrepublik Deutschland historisch oder aktuell wichtigen Tollwutimpfstoffe dargestellt und dann die Ergebnisse der Impfstudie an den Münchener Probanden präsentiert und diskutiert werden.

II. LITERATUR

A. Ätiologie der Tollwut - Das Tollwutvirus (TWV)

Vor dem 19. Jahrhundert wurde ein derbes Stützgebilde im lockeren subepithelialen Bindegewebe an der Bodenfläche der Fleischfresserzunge, der sog. Wutwurm, als Ursache der Tollwut (Lyssa, griech. = Wölfin) angesehen (88). ZINKE bewies 1804 die Infektiosität des Speichels von tollwutkranken Hunden (156), und LOUIS PASTEUR stellte fest, daß das rabiesauslösende Agens im Zentralnervensystem der Patienten in konzentrierter Form enthalten ist (98). 1903 wies REMLINGER die Filtrierbarkeit des Tollwutvirus nach (107).

Seit 1966 wird das Tollwutvirus zur Rhabdovirus-Gruppe (rhabdos, griech. = Stab, Stift) gerechnet (86). Die Familie Rhabdoviridae umfaßt mehr als 70 verschiedene Rhabdoviren, deren Standorte Säuger, Fische, Arthropoden und Pflanzen sind (45). Innerhalb des Genus Lyssavirus werden als Serotyp 1 die Mehrzahl aller heute auf der Welt vorkommenden Feld- und Laborstämme des klassischen Tollwutvirus zusammengefaßt (122). Die Bezeichnungen "Straßenvirus" (virus des rues) für die unter natürlichen Bedingungen vorkommenden Tollwutvirusstämme und "Virus fixe" für laboratoriumsadaptierte, vielfach passagierte Stämme gehen auf PASTEUR zurück (73). Die Serotypen 2, 3 und 4 des Genus Lyssavirus (Lagos Bat, Mokola, Duvenhage) werden als Tollwut-ähnliche Viren (rabies-related viruses) angesprochen. Andere Rhabdoviren sind u.a. das Ephemeral-Fieber-Virus, das Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), das Marburg-Virus, das Egdved-Virus (Erreger der viralen hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle, VHS) und das Spring viremia of carp - Virus (SVC-Virus).

Das Tollwutvirion hat zylindrische Gestalt mit einem abgestumpften kegelförmigen und einem flachen Ende; es wird mit "bullet - shaped" (geschoßähnlich) beschrieben. Bei einer Länge von 180 bis 200 nm und einer Breite von 75 bis 80 nm trägt die Oberfläche 6 bis 8 nm lange Protrusionen oder 'Spikes' mit distalen Verdickungen (5). Das Gesamtvirion setzt sich zusammen aus dem Nukleokapsid mit helikaler (helix, griech. = Windung) Symmetrie (core = Herz, Kern) und einer lipidhaltigen, die oben erwähnten Spikes tragenden Doppelmembran (envelope = Hülle). Zur Analyse des Nukleokapsids kann die Virushülle entweder durch Desoxycholat- oder Nonidet P 40-Behandlung abgetrennt werden. Die Oberflächenprojektionen können nach Solubilisierung mit Triton X 100 durch isoelektrische Fokussierung rein dargestellt werden (121).

Die physikalischen Eigenschaften des Tollwutvirion und seiner Untereinheiten nennt Tabelle 1.

Das Nukleokapsid beherbergt das TWV-Genom, eine einsträngige, rechtsgewundene, nicht segmentierte und nicht infektiöse Ribonukleinsäure (RNA), die negative Polarität aufweist (48).

Aus gereinigten Tollwutviruspräparaten konnten SOKOL et al. (1968) nach Behandlung mit Trichloressigsäure, hochmolekularer Harnstofflösung und 2-Mercaptoethanol in der Acrylamidgelelektrophorese sieben Polypeptide darstellen (131), darunter die fünf Strukturproteine des TWV: L-, G-, N-, NS-, und M-Protein. COX (1982) und CRICK (1985) konnten zeigen, daß das früher als M-1-Protein bezeichnete und damit ebenfalls der Virushülle zugerechnete Strukturprotein am Nukleokapsidaufbau beteiligt und damit als NS-Protein anzusprechen ist (27 , 28). Über Eigenschaften und Bedeutung der einzelnen Strukturproteine des TWV gibt Tabelle 2 Auskunft.

Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften des TWV und seiner Untereinheiten

	Sedimentations- koeffizient (S_{20}^w)	Schwebedichte (boyant density) (g/ml)	Molekulargewicht (Dalton)	Größe (nm)
TWV-Partikel	600	1,20	-	75 x 180
Ribonukleo- kapsid	200	1,32	-	50 x 165
Oberflächenpro- jektionen	2,8	k.A.	-	6 - 8
Nukleinsäure (RNA)	45	1,66	$4,6 \times 10^6$	4600
k.A. = keine Angaben				
Nach SCHNEIDER u. DIRINGER (1976) und KUWERT (1970)				

Tabelle 2: Strukturproteine des TWV

Protein	MG	Bezeichnung	Bedeutung	% Gesamtvirus- protein	Exemplare pro Virion
G					
G _I	80 000	Glykoprotein	spikes, Virusneutra- lisation, Immunität	45 - 50	1783
G _{II}	71 - 75 000				
L	190 000	large protein	Assoziation mit Trans- kriptaseaktivität	k.A.	17 - 150
N	62 000	Nukleokapsid- Protein	core, Gruppenspezifi- tätssantigen für Lyssa- Genus	31 - 34	1713
NS					
NS _I	42 000	core protein (früher M 1)	Assoziation mit N- Protein	8 - 10	789
NS _{II}	38 000				
M	25 000	Membranprotein (früher M 2)	Membran, Brücke zwi- schen G- und N-Pro- tein	10 - 13	1661

k.A. = keine Angaben

G_I = G-Protein aus den Virusstämmen CVS, PM, ERA NS_I = NS-Protein aus den Virusstämmen HEP, CVS, PM, ERA

G_{II} = G-Protein aus den Virusstämmen CVS, PM, HEP NS_{II} = NS-Protein aus den Virusstämmen HEP, CVS, PM

Nach COX (1982), KUMERT u. SCHEIERMANN (1986), SCHNEIDER u. DIRINGER (1976)

Neben RNA und Proteinen besteht das Tollwutvirion zu 26 % seiner Trockenmasse aus Lipiden und zu 3 % aus Kohlenhydraten (116). Der Lipidgehalt erklärt den Infektiositätsverlust von TWV nach Behandlung mit organischen Lösungsmitteln oder Phospholipase C (61). Daneben ist TWV empfindlich gegenüber sauren pH-Werten; durch 0,25 - 0,9%iges Formalin sowie 1 - 2%ige Natronlauge erfolgt rasche Inaktivierung. Beim Einwirken verschiedener Temperaturen auf TWV werden folgende Zeiträume bis zum Verschwinden der Infektiosität beobachtet:

0° bis + 8°C	2 Monate
+ 18°C	23 Tage
+ 37°C	5 Tage
+ 56°C	4 - 5 Stunden
+ 70°C	wenige Minuten

Tierkadaver können bis zu 90 Tagen Virus enthalten (110).

Die wichtigsten biologischen Eigenschaften des TWV sind seine Pathogenität für den Menschen, warmblütige Säugetiere und Vögel, seine Infektiosität für Zellkulturen neuralen und nicht-neuralen Ursprungs, seine Antigenität und seine Fähigkeit zur Hämagglutination von Gänse-, Eintagsküken- und Meerschweinchenerythrozyten (61). Sowohl die Hämagglutination durch Tollwutvirus als auch deren Hemmung durch gegen das Lyssavirus gerichtete spezifische Antikörper können genutzt werden, einerseits zur Quantifizierung (Titrierung) gereinigten Virusmaterials, andererseits zum Nachweis und zur Quantifizierung von rabieesspezifischen Serumantikörpern im Hämagglutinationshemmungstest (HHT) (67).

Das Tollwutvirus ist ein starkes Antigen. Das macht auch folgende Überlegung deutlich: In virushaltigen Gehirnsuspensionen beträgt das Verhältnis von Wirtsgewebeantigenen zu Virusantigenen etwa 10^9 : 1. Anders ausgedrückt:

In 20 000 Zentnern Gehirngewebe, das noch heute in vielen Ländern der Dritten Welt in großem Maße als Ausgangsmaterial für die Vakzine nach HEMPT verwendet wird, ist etwa 1 g Virusantigen enthalten (63). Diese Gehirnsuspensionen führen dennoch zu - wenn auch geringen - virusspezifischen Antikörpertitern.

Zur detaillierten Untersuchung antigenen Eigenschaften des Lyssavirus bedarf es jedoch konzentrierten und gereinigten Virusmaterials zellkulturellen Ursprungs. Eine solche Reinigungsmethode haben SOKOL et al. (1968) beschrieben. Die Reinigung umfaßt Zinkacetatpräzipitation des kruden Virus aus der Zellkulturflüssigkeit, Resolubilisierung mit EDTA-Na, Entsalzung mittels Sephadex-G-75-Filtration sowie Behandlung mit Ribonuclease und Desoxyribonuclease. Schließlich erfolgt Sedimentation in der präparativen Ultrazentrifuge (50.000 g, 60 min.) und weitere Reinigung im linearen 10-55% (w/w) Sucrosegradienten (90 min.). Das Endpräparat ist 1.000 bis 3.000fach gereinigt, wenn man das Verhältnis Infektiosität:Protein als Maßstab zugrundelegt (131a).

Seitdem es gelang, die einzelnen Virusbestandteile aus dem integren Virusverband unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität herauszulösen und rein darzustellen - z. B. das G-Protein durch SOKOL et al. (1971) - und es darüber hinaus erreicht wurde, unter Verwendung gereinigter Virusbestandteile Antisera nur gegen einzelne Komponenten des TWV herzustellen - z. B. DIETZSCHOLD et al. (1976) wiederum für das Glykoprotein, muß die Antigenität des TWV nach seinen einzelnen Strukturelementen getrennt betrachtet werden.

Tabelle 3 gibt an, welche Arten Antikörper von Ganzvirion-Präparationen, Nukleokapsidantigen oder Glykoproteinantigen induziert werden. Die in vitro virusneutralisierend wirkenden, rabiesspezifischen Antikörper gelten als die

Tabelle 3: Aktivitäten von TWV-Antikörpern gegen gereinigte Ganzviren-Präparationen, Nukleokapsidantigen und Glykoproteinantigen

	Ganzvirenantigen	Nukleokapsidantigen	Glykoproteinantigen
VN-Akk	+	-	+
Schützende Akk	+	-	+
KB-Akk	+(2x)	+	+
HH-Akk	+	- /	-
Immunodif- fusionstest	2 Banden	1 Bande (serumfern)	1 Bande (serumnah)
Immunzytolyse	+	-	+
Fluoreszeinfärbung	membranständig + intrazytoplasmatisch	intrazytopl. (Negri-Körperchen)	membranständig

Erläuterungen zu Tabelle 3:

- VN-Akk virusneutralisierende Antikörper
- KB-Akk komplementbindende Antikörper
- HH-Akk hämagglutinationshemmende Antikörper

in vivo vor TWV-Infektion schützenden Agentien. Das biochemische Korrelat der schützenden Antikörperfunktion stellen die Immunglobuline der Klasse G (7S) dar. Obwohl auch die zur Immunglobulinklasse M (19S) gehörenden Serumantikörper in vitro virusneutralisierend wirken, tragen sie zum Schutz vor Tollwutkrankung wegen deren besonderer Pathogenese (siehe dort) vermutlich wenig bei. Denn IgM-Antikörper können aufgrund ihrer Größe nicht die Strombahn verlassen und die Blut-Hirn-Schranke passieren. IgM-Antikörper vermögen also nicht, die humorale Immunität auf das primäre Zielorgan des TWV, das Nervensystem, zu übertragen (70). Und so konnte auch TURNER (1978) im Tierversuch zeigen, daß Mäuse passiv durch IgG-Antikörper sehr wohl vor einer Belastungsinfektion geschützt werden konnten, durch reine IgM-Antikörper mit gleichhohem Neutralisationstiter jedoch nicht. Außerdem half den Mäusen eine vor TWV-Infektion durchgeführte Vakzination dann nicht, wenn durch Cyclophosphamid-Behandlung die IgG-Synthese bei den Tieren verhindert wurde (141).

Bis in die fünfziger Jahre führten Untersuchungen zum Komplementverbrauch bei lyssaspezifischen Ag-Ak-Reaktionen nicht zum Einzug der Komplementbindungsreaktion (KBR) in die Tollwutdiagnostik. BINDRICH und KUWERT (1957) beschrieben dann eine Methode zur Herstellung eines hochwertigen, spezifischen, komplementbindenden Hyperimmunserums zum Nachweis lyssaspezifischen Antigens aus Gehirngewebe tollwutverdächtiger Tiere. Dieselben konnten unspezifische komplementverbrauchende Ag-Ak-Reaktionen zwischen Hirngewebsbestandteilen (Cerebroside, Ganglioside etc.) und Hyperimmunserum weitgehend unterdrücken, indem sie das ebenfalls aus Gehirngewebe stammende Antigen zur Immunisierung der caninen Serumspender mit Chloroform behandelten.

Seitdem gereinigtes und konzentriertes TWV-Antigen zell-kulturellen Ursprungs zur Verfügung steht und auch in der KBR zur Bestimmung von TWV-Antikörpern zum Einsatz kommt (66), ergibt sich eine enge Korrelation zwischen komplementbindenden und neutralisierenden Ak-Titern (68).

Sowohl reine Anti-Nukleokapsid-Seren als auch nur gegen das Glykoprotein gerichtete Seren weisen komplementbindende Aktivität auf. Nukleokapsid und Glykoprotein fungieren als zwei distinkte, komplementbindende Virusantigene. Und auch bei Verwendung nur des Glykoproteins als Antigen in der KBR korrelieren neutralisierende und komplementbindende Serum-Ak-Titer (121).

Auf die hämagglutinierende Eigenschaft von Tollwutvirus und die Hämagglutinationshemmung durch TWV-Antikörper wurde schon hingewiesen. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen infektiösen TWV-Quantitäten (z.B. Plaquebildenden Einheiten (PFU)/ml) und hämagglutinierenden Viruseinheiten (HAU) im Verhältnis von 10^6 : 1 (67). Rein dargestelltes Glykoprotein zeigt keine hämagglutinierende Aktivität (37). Die Fähigkeit des TWV zur Hämagglutination ist offensichtlich vom Erhalt der viralen Membranintegrität abhängig.

Im Immunodiffusions- oder Agargelpräzipitationstest läßt man Virusantigen im halbfesten Medium gegen ein korrespondierendes Serum diffundieren. Enthält das Serum antigenspezifische Akk so bilden sich zwischen den Auftragspunkten von Ag und Serum Niederschlagslinien oder Präzipitatbanden aus. Setzt man Tollwutvirus als Ag und Anti-Virion-Serum als Antikörperkollektion ein, so erscheinen zwei Präzipitationsbanden, von denen die serumnahe die Akk gegen das G - Protein und die serumferne solche gegen das Nukleokapsidantigen repräsentieren (122).

Virionspezifische Antikörper vermögen in Gegenwart von Komplement tollwutvirusinfizierte Zellen zu zerstören (Immunzytolyse) (146). Diese immunzytolytischen Akk werden nur durch das Glykoprotein induziert. Die immunzytologische Aktivität korreliert eng mit der virusneutralisierenden (122).

Auch Tollwutvirus-Akk lassen sich nach dem von COONS entwickelten Verfahren mit fluoreszierenden Farbstoffen koppeln (26). Verwendung finden Tollwutimmunserum oder dessen Gamma-Globulin-Fraktion und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Inkubiert man TWV-haltiges Material mit diesem Serum-FITC-Konjugat, erscheinen nach Ablauf der Reaktion unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierende Antigen-Ak-Komplexe. Die fluoreszierende Antikörper-(FA-)Technik wird als direkte Methode zur Identifizierung von Tollwutvirus in Mäusehirngewebe und Zellkulturen (34) und in ZNS-Präparaten natürlich infizierter Tiere zur Diagnostik (117) genutzt. Ebenso kann intra vitam bei Lyssapatienten - Menschen wie Tieren - in Korneaabklatschpräparaten mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode TWV-Antigen nachgewiesen werden (118). Werden Tollwuthyperimmunseren gegen Ganzvirionpräparationen mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert, so wird im Fluoreszenzmikroskopischen Bild TWV-Antigen sowohl membranständig als auch in Form intrazytoplasmatischer Strukturen sichtbar. Bei Verwendung von Anti-Glykoprotein-Seren tritt nur membranständige Fluoreszenz auf. Bei Verwendung von Anti-Nukleokapsid-Seren dagegen stellen sich nur intrazytoplasmatisch homogene Matrizes, die mit den NEGRIschen Einschlußkörperchen übereinstimmen, und für Tollwut spezifische Aggregate mit variabler Größe bis hinab zur Grenze der Sichtbarkeit dar. (117, 121).

In jüngerer Zeit haben die großen Fortschritte der Molekulargenetik auch bezüglich des Tollwutvirus Einblicke in

dessen Genom und die Expression seiner Struktureigenschaften ermöglicht. ANILIONIS, WUNNER und CURTIS (1981) haben die Nukleotidsequenz des Glykoproteingens für den Tollwutvirusstamm ERA aufgeklärt. Der Begriff 'Gen' wird hier molekularbiologisch gebraucht, als der Abschnitt einer Nukleinsäure, der die Information zur Synthese eines Proteins enthält. ANILIONIS et al. haben die Messenger-RNA (m-RNA) für das G-Protein aus einem Extrakt tollwutinfizierter BHK-Zellen isoliert. Unter Verwendung von oligo(dT) - Oligodesoxythymidin als Initiator ("primer") der Reaktion -, reverser Transkriptase aus Aviärem Myeloblastose Virus (AMV) und E. coli-DNA-Polymerase stellten sie eine doppelstrangige Komplementär-DNA - (ds)cDNA - her, die über das Plasmid pBR 322 in das Genom des Bakterienstammes E. coli chi 1776 eingeführt wurde. Die Nukleotidsequenz der cDNA wurde bestimmt und daraus ein 524 Aminosäuren enthaltendes Polypeptid entworfen. Durch Vergleich mit dem Glykoprotein des Semliki Forest Virus (SFV) sprechen die Autoren den 22 Aminosäuren langen, hydrophoben Proteinabschnitt nach der Aminosäure Lysin in Position 439 als den die Virusmembran kreuzenden Abschnitt an ('transmembrane segment'). Nur das dann folgende hydrophile Segment bis zum C-terminalen Leucin in Position 505 soll intrazytoplasmatisch lokalisiert sein und der Interaktion mit viralem Matrix- und Nukleokapsidprotein dienen.

Aus der von ANILIONIS et al. (1981) dargestellten cDNA mit der Nukleotidsequenz für das Rabies-Glykoprotein und dem Vacciniavirus (Stamm WR) haben WIKTOR et al. (1984) ein vaccinia-rabiesglykoprotein-rekombiniertes Virus (V-RG-Virus) hergestellt.

Mit diesem V-RG-Virus infizierte BHK-21-Zellen produzierten ein neues Protein, das mit polyklonalem Anti-G-Serum immunpräzipitiert werden konnte. Andere Testsysteme

(Immunfluoreszenz, monoklonale Anti-G-Antikörper, virus-neutralisierende Ak-Induktion) zeigten jedoch, daß das exprimierte Protein dennoch nicht identisch mit dem nativen TWV-Glykoprotein war. Direkte N-terminale Aminosäurenanalyse nativen Tollwut-G-Proteins ergab, daß die Aminosäure Prolin die Position 8 des G-Proteins besetzt, während der oben beschriebene cDNA-Klon in Position 8 für Leucin codiert. WIKTOR et al. (1984) haben dann durch Mutagenese in Position 8 die Aminosäure Prolin eingepaßt. Eine mit dem dann gebildeten vaccinia-rabiesglykoprotein (pro8)-rekombinierten Virus infizierte BHK-21-Kultur synthetisierte ein mit dem nativen Tollwut-G-Protein identisches Protein. Mehr noch: Nach nur einmaliger Inokulation des rekombinierten V-RGpro8-Virus waren Mäuse und Kaninchen gegen Infektion mit einer hohen TWV-Challenge-Dosis (2400 bzw. 24.000 MausLD₅₀) geschützt.

Ebenso haben YELVERTON et al. (1983) mRNA des CVS-Tollwut-virusstammes in doppelstrangige cDNA umgeschrieben und mit Hilfe des Plasmids pBR 322 in das Genom des Bakterienstammes E. coli W 3110 eingeführt. Die beiden neu entstandenen Plasmide pRabdex1 und pRabdex2 codierten für zwei glykoproteinanaloge Polypeptide mit 427 bzw. 505 Aminosäuren (G₄₂₇, G₅₀₅). Im ELISA wurde die Ak-Bindungsfähigkeit des RabiesG-Protein aus E. coli im Vergleich mit viralem Glykoprotein bestimmt. Diese betrug 70 % der Bindungsfähigkeit des authentischen G-Proteins für G₄₂₇ und 90 % für G₅₀₅. Versuche zur Antikörperinduktion oder gar zur Schutzkraft des Glykoproteins aus bakterieller Expression stehen noch aus.

B. Pathogenese und Klinik der Tollwuterkrankung

Der Mensch infiziert sich mit dem TWV (fast) ausnahmslos durch Biß eines tollwutinfizierten und virusausscheidenden Tieres oder durch Eindringen von TWV in präexistente Hautwunden (Zooanthroponose). Die Infektkette wird bei der in Europa zur Zeit herrschenden silvatischen Wutform durch infizierte Rotfüchse (*Vulpes vulpes*), in tropischen und subtropischen Regionen und in früheren Zeiten auch in Europa durch streunende, halbwildlebende Hunde (*Canis familiaris*) und Katzen (*Felis domestica*) aufrechterhalten (urbane Wutform) (134). Die urbane Verlaufsform trat in Europa z. B. in Form des Seuchenzugs während und nach dem ersten Weltkrieg in den Jahren von 1915 bis 1925 auf (135). Andere rabiesübertragende Tiere sind der gestreifte Skunk (*Mephitis mephitis*) in Nordamerika und blutleckende Fledermausarten (*Vampir*, *Desmodus rotundus murinus*) in Mittel- und Südamerika (134). Seit Ende des zweiten Weltkrieges erkrankten und starben in Deutschland (Bundesrepublik und DDR) 49 Menschen an Tollwut, davon 35 nach Hunde-, 8 nach Fuchs- und 4 nach Katzenkontakt. In einem Fall wurde die Lyssa von einem Rind übertragen, einmal war die Infektionsquelle nicht mehr auszumachen (74).

Bei den oben angedeuteten Ausnahmen von der Tollwutübertragung durch Biß oder Eindringen von Virus in offene Wunden handelt es sich um Ende der 70er Jahre beschriebene Tollwutfälle nach Korneatransplantation in Frankreich (33) und den Vereinigten Staaten (46) und Tollwutinfektionen nach Inhalation virushaltiger Aerosole in Fledermaushöhlen oder Laboratorien (1). Über den Anteil unbehandelter Patienten, die nach Viruskontakt an Tollwut erkrankten, gibt es verständlicherweise keine gesicherten Zahlen. KUWERT und SCHEIERMANN (1984) nennen 10 - 50 % bei einer Inkubationszeit von 1 bis 3 Monaten.

Um den Weg des TWV im Labortier zu verfolgen, wird das Auftreten von Virusantigen in zeitlicher Abfolge in den einzelnen Geweben immunfluoreszenztechnisch nachgewiesen oder durch Titration die Infektiosität/g Gewebe bestimmt. Am Versuchstier geben Amputationsversuche nach distaler Virusinokulation Auskunft über die Wanderungsgeschwindigkeit des TWV in Richtung ZNS (93).

Die erste Virusvermehrung konnten MURPHY und BAUER (1974) bei neugeborenen Hamstern in quergestreiften Muskelzellen nahe des Eintrittsortes an den Hintergliedmaßen mittels FA-Technik nachweisen. Eintrittsorte in das periphere Nervensystem sind die Muskelspindeln und Sehnenorgane. Da auch die motorischen Endplatten nicht myelinisiert und daher "ungeschützt" sind, geht MURPHY (1977) auch von einer TWV-Besiedlung dieser Strukturen des peripheren Nervensystems aus. Passiver zentripetaler Transport innerhalb des Axoplasmas mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 mm/Std. schließt sich an (9).

Zu einer Vermehrung des TWV kommt es erst wieder in den Perikaryen der Spinalganglien. Die Vervielfältigung des Virusmaterials an dieser Stelle dient vermutlich der horizontalen Verbreitung der Infektion auf der Ebene eines Segmentes. Nach Eintritt in das Lumbalmark dauert die Viruspassage zum Hirnstamm bei Ratte, Maus und neugeborenem Hamster nur einige Stunden (8 , 29 , 90).

SCHNEIDER hat (1969) bei der Maus zwischen 50 und 112 Stunden nach Virusinokulation in eine Hinterpfote TWV in den Spinalganglien nachgewiesen. Nach 130 Std. waren Rückenmark und Medulla oblongata infiziert, und 192 Std. nach Inokulation gelang der Virusnachweis im gesamten ZNS. Gleichzeitig setzte Paralyse der Hintergliedmaßen ein. Die Tiere starben am 12. oder 13. Tag p. i.

Hat die Infektion das Gehirn erreicht, so ergibt sich ein deutlicher Gradient abnehmenden Virusgehaltes vom Hirnstamm zum Großhirn. Dieser läßt sich erneut sowohl mittels Immunofluoreszenz als auch durch Titrierung der Infektiosität nachweisen (91,120). Besonders große Virusaggregate, die auch lichtmikroskopisch als NEGRI-Körperchen darstellbar sind, erscheinen in den Pyramidenzellen des Hippocampus, den Neuronen der Nuclei pontis und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns (93).

Die histologischen Veränderungen nach Infektion mit Straßenvirus sind erstaunlich gering ausgeprägt. DUPONT und EARLE werteten 1965 49 Fälle von Lyssa beim Menschen aus und fanden histopathologisch bei 54 % eine Encephalitis, vorwiegend mit Lymphozyten- und Plasmazellenbeteiligung. In 70,9 % der Fälle konnten NEGRI- Körperchen nachgewiesen werden; fehlten diese, waren allein aufgrund der Histologie Poliomyelitis oder andere Formen viraler Encephalitiden differentialdiagnostisch nicht auszuschließen (31).

Entzündliche mononukleäre Infiltrationen perivaskulär in Spinalganglien, Rückenmark und Hirnstamm sind beim Menschen in Fällen mit längerem klinischen Verlauf stärker ausgeprägt (93). Deutliche histologische Veränderungen treten dagegen bei Versuchstieren nach Infektion mit Virus-fixe-Stämmen auf. Diese sind: Ganglienzellnekrose, zytoplasmatische Kondensation, Neuronophagie und interzelluläres Ödem.

Das ZNS ist das Zielorgan des TWV. Dennoch bedarf es wegen der besonderen Epizootiologie der Virusausscheidung durch infizierte Individuen und damit des Erscheinens von Virus auf der Körperoberfläche. Der zentrifugale Virustransport erfolgt wieder entlang der Nervenbahnen innerhalb des Axoplasmas. Regelmäßig erscheint das Virus dann in ZNS-nahen Lokalisationen wie Kornea, Speicheldrüsenepithel, Nerven-

endigungen in Kopf- und Nackenhaut, Geschmacksknospen der Zunge und den olfaktorischen Sinneszellen der Nasenschleimhaut. TWV-Nachweis in Korneaabklatschpräparaten, Speichel und Nackenhautbiopsien dient der ätiologischen Diagnose ante mortem. Aber auch das Pankreas und die chromaffinen Zellen der Nebenniere sind regelmäßig infiziert, während die großen Parenchyme Leber, Milz, Niere und Lunge in den Untersuchungen von MURPHY et al. (91) kein TWV aufwiesen. Zu keinem Zeitpunkt der Infektion tritt eine Virämie auf.

Das klinische Bild der Tollwut des Menschen haben u.a. KÖTTGEN (1970) bei einem zwölfjährigen Mädchen und TSCHERSICH et al. (1978) bei einem 29jährigen Mann beschrieben. In den beiden Fällen kam es 51 Tage bzw. sechs Wochen nach Hundebiß zu den ersten Symptomen. Diese waren Parästhesien bzw. Schmerzen in den von den Bissen betroffenen Gliedmaßen. Am dritten Krankheitstag betrug die Körpertemperatur 38,5 bzw. 38,7°C. In beiden Fällen trat Luftnot sehr bald auf. Sodann entwickelten sich Extremitäten- und Schlundkrämpfe mit anhaltender Apnoe, die durch die Annäherung eines Wasserglases oder auch nur das Laufen eines Wasserhahnes auslösbar waren (klassische Hydrophobie). Nach Einsetzen einer Ateminsuffizienz wurden beide Patienten zunächst assistiert, später kontrolliert beatmet. Der männliche Patient zeigte fortschreitende Lähmungserscheinungen wie Tetraparalyse, Paralyse sämtlicher Atemmuskeln bis hin zum Verlust der letzten Spontanbewegungen im Bereich der Mund- und Kiefermuskulatur am 19. Krankheitstag. In beiden Fällen wurde Lyssavirus im Korneaabklatschpräparat und im Speichel nachgewiesen. Beide Patienten wiesen am 18. Krankheitstag einen hochgradig eiweißreichen Liquor, in einem Fall mit offenbar reichlich Detritus, auf und verstarben 21 bzw. 22 Tage nach Krankheitsbeginn. Ohne intensivmedizinische Maßnahmen tritt der Tod bereits nach vier bis sechs Tagen ein (73). Der Nachweis für das Überleben eines

Menschen nach Tollwuterkrankung wurde bisher weltweit nur zweimal erbracht (38 ,105).

Aus dem dargestellten Weg des Virus im Wirtsorganismus geht hervor, daß nach dem Eindringen des TWV in das periphere Nervensystem bis zur späten Besiedlung der für die Transmission wichtigen Organe wie Speicheldrüsen, Nasenepithel etc. ein strenger viraler Neuronotropismus herrscht. Deshalb präsentiert sich das Virus erst sehr spät immunologisch kompetenten Zellen (Makrophagen, B- und T-Lymphozyten), die eine Abwehrreaktion des Wirtes initiieren können. So treten neutralisierende Antikörper erst nach dem Einsetzen klinischer Symptome im Serum oder Liquor cerebrospinalis auf und erreichen unmittelbar präfinal hohe Titer (73).

Neben dieser späten humoralen Immunantwort auf eine Tollwutinfektion ist im Tiermodell auch eine zellvermittelte Immunreaktion nachzuweisen. 1977 konnten WIKTOR et al. zeigen, daß nach Immunisierung mit attenuiertem ERA-Tollwut-Virus gewonnene murine Milzzellen TWV-infizierte Targetzellen erkennen und zerstören. Sowohl durch Behandlung mit Antithymusserum und Komplement als auch durch Auftrennung der Milzzellensuspension über eine Nylonwollsäule bewiesen dieselben, daß es sich dabei um zytotoxische T-Lymphozyten handelt. 1982 haben SMITH et al. dann über rabiesspezifische zellvermittelte Zytotoxizität auch nach Infektion von Mäusen mit Straßenvirus berichtet.

Bei Hamstern (136) und Mäusen (130) kann nach TWV-Infektion in Gehirnmateriel parallel zum Virusgehalt Interferon nachgewiesen werden.

Alle drei z.T. nur für das Versuchstier beschriebenen Immunantworten auf das Lyssavirus (Antikörper, zellvermittelte Zytotoxizität, Interferon) vermögen nicht, den ungünstigen Krankheitsverlauf beim unbehandelten Patienten aufzuhalten.

C. Lokale Maßnahmen nach Tollwutexposition und passive Immunisierung

Aus den TWV-Eigenschaften (lipidhaltige Membran, Infektivitätsverlust nach Behandlung mit Detergentien oder Alkohol) lassen sich die Maßnahmen ableiten, die nach Expositionsverdacht ergriffen werden sollten, um eingedrungenes Virus möglichst zu neutralisieren oder zumindest mechanisch so weit wie möglich zu entfernen. Die Weltgesundheitsorganisation (1984) und das Bundesgesundheitsamt (1985) empfehlen deshalb, Biß- und Kratzwunden, die durch tollwütige oder tollwutverdächtige Tiere beigebracht wurden, unverzüglich mit viel Wasser und Seife gründlich zu waschen und auszuspülen. Die Wunden sollen dann mit 40-70%igem Ethanol oder 0,1%igen quaternären Ammoniumbasen behandelt werden. Vor Anwendung der letzteren müssen Seifenreste gründlich ausgespült werden. Eine Wundnaht sollte möglichst unterbleiben.

KAPLAN et al. (1962) untersuchten die protektive Wirkung verschiedener Substanzen nach lokaler Anwendung beim Meerschweinchen. Dabei wurde CVS-Virussuspension mit einer Lanzette 5 mm tief in den M. gastrocnemius verbracht und die so beigebrachten Stichwunden 1 Stunde später lokal behandelt. Einen Schutzeffekt vor TWV-Infektion hatten quaternäre Ammoniumverbindungen, das Auswaschen mit 20%iger Seifenlösung und unverdünnte Anti-Tollwut-Immunglobulin-Lösung vom Pferd, aber auch 70%ige Salpetersäure, das Lokalanästhetikum Prokain und Interferon aus Meerschweinchenkulturen. Keine protektive Wirkung hatten Jodlösung, Thiomer-sal, ein Antihistaminikum, Phenoxybenzamin und Physostigmin.

Die W.H.O. fordert nach Belecken von Schleimhäuten oder großen Bissen kopfnah oder in die Hände durch tollwütige oder tollwutverdächtige Tiere auch die Verabreichung von Antitollwutserum in einer Dosierung von 20 I.E./kg KGW für homologe Immunglobulinpräparationen bzw. 40 I.E./kg KGW

für von Tieren stammendes Immuns serum. Die Hälfte der Gesamtmenge soll um die Wunde herum möglichst i.m. infiltriert werden (153).

Das Wissen um die Möglichkeit, einen Schutz gegen Tollwutinfektion mit dem Serum zuvor geimpfter Individuen passiv zu übertragen, ist bald 100 Jahre alt. 1889 konnten BABES und LEPP bei Hunden mit defibriniertem Blut virus-fixe-immunisierter Artgenossen die Tollwuterkrankung nach experimenteller Infektion verhindern.

HABEL (1945) und KOPROWSKI et al. (1950) wiesen im Tierversuch nach, daß sowohl die alleinige Verabreichung heterologen Hyperimmuns erums, als auch die gleichzeitige Anwendung von Hyperimmuns erum und Vakzine zu besserem Rabiesschutz führte als die bloße postexpositionelle, aktive Vakzination. Daraufhin empfahl 1950 die W.H.O., in einer Studie am Menschen den Nutzen von heterologem Tollwuthyperimmuns erum in der postexpositionellen Prophylaxe nach Biß durch tollwutkranke Wölfe zu überprüfen. Die Gelegenheit dazu bot sich 1954 in Sahneh/Iran. Bei 29 von einem tollwütigen Wolf z.T. schwer verletzten Personen wurde der kombinierte Einsatz von Tollwuthyperimmuns erum vom Kaninchen und 21 Dosen Semple-Gehirnimpfstoff mit der alleinigen Impfstoffverabreichung verglichen. Die Überlebensrate nach Kombinationsbehandlung betrug 12/13 (92%), nach alleiniger Vakzineanwendung 2/5 (40%) bei vergleichbaren Verletzungen (13). Die Ergebnisse verhalfen der simultanen Serovakzination zum Durchbruch.

1971 beschrieben CABASSO et al. (25) Gewinnung und Dosisermittlung für Tollwutimmunglobuline aus der Gammaglobulinfraktion des Serums menschlicher vakzinierter Spender. Diese RIGH-Präparate (Rabies Immune Globulin of Human Origin) zeichnen sich wegen fehlender Fremdantigenität

gegenüber heterologen Antitollwutseren durch bessere Verträglichkeit aus. So konnten z.B. HATTWICK et al. (1976) (39) bei 19 von 59 Probanden (39%), die heterologes Antitollwutserum erhalten hatten, eine Serumkrankheit beobachten, während alle 43 mit RIGH behandelten Patienten davon verschont blieben. Heterologes Antitollwutserum machte ausserdem wegen seiner ausgeprägten immunsuppressiven Wirkung bei gleichzeitiger aktiver Vakzinierung mit Gehirngewebe- oder Entenembryoimpfstoffen zusätzliche Boosterinjektionen dieser wenig potenten Vakzinen erforderlich, bis hin zu 23 Injektionen im Falle der Entenembryovakzine (72).

KUWERT et al. stellten dagegen 1978 für die simultane Anwendung von RIGH (20 I.E./kg KGW) und HDCS (Human Diploid Cell Strain)-Vakzine bei 19 Probanden keine Inhibition der humoralen Immunantwort fest. MERTZ et al. (1982) bestätigten kürzlich das Ausbleiben einer humoralen Immunsuppression bei gleichzeitiger Verabreichung von RIGH und HDCS-Vakzine. In ihrer Studie trat eine reduzierte Antikörperinduktion durch HDCS-Vakzine nur dann auf, wenn erst vier Tage nach RIGH-Verabreichung erstmalig aktiv immunisiert wurde (87).

In einer ersten Untersuchung zu dieser Fragestellung, in der RIGH und die neue PCEC-Vakzine zum Einsatz kamen (80), konnten neutralisierende Serumantikörper sowohl früher als auch mit höheren Titerwerten nachgewiesen werden, wenn RIGH (20 I.E./kg KGW am Tag 0) zusätzlich zur sechsmaligen aktiven Immunisierung gegeben wurde. Allerdings differierte auch die Antigenität (Antigenic Value) der jeweils eingesetzten Vakzinechargen: 7,5 IU/Dosis für den in Kombination mit RIGH angewandten PCEC-Impfstoff und 2,7 IU/Dosis für die ohne RIGH verimpfte PCEC-Charge.

D. Tollwutimpfstoffe aus Gehirngewebe adulter Tiere

LOUIS PASTEUR (27.12.1822 - 28.9.1895) gilt als der Begründer der post-expositionellen Tollwutprophylaxe durch aktive Immunisierung. Er benutzte an Kaninchen adaptiertes Tollwutvirus (Virus fixe) und immunisierte durch Inokulation von Rückenmarksuspension Virus fixe infizierter Versuchstiere nach unterschiedlicher Trocknungsdauer des post mortem gewonnenen Kaninchenmarks. Eine Impfserie begann mit einer Suspension aus 14 Tage lang mit Kalium-Hydroxid getrocknetem Rückenmark, und die Trocknungsdauer des am Ende der Impfserie aus 13 Injektionen verwandten Ausgangsmaterials betrug nur noch drei Tage. Dieses Verfahren konnte von PASTEUR etabliert werden, nachdem er am 7.7.1885 den von einem tollwütigen Hund 14 mal gebissenen JOSEPH MEISTER durch seine Kur vor der Tollwut bewahrte (99).

Der Originalimpfstoff PASTEURS muß als abgeschwächte Lebendvakzine angesprochen werden. FERMI (1908) und SEMPLÉ (1911) unterzogen die krude Organsuspension einer Phenolbehandlung, um das Impfvirus zu inaktivieren. Während FERMI mit seiner Phenolinaktivierung bei 22°C nur eine unvollständige Inaktivierung erreichte, weist die Vakzine nach SEMPLÉ, bei deren Herstellung Phenol bei 37°C auf die Gehirnsuspension einwirkt, keinerlei Restinfektiosität mehr auf.

Tabelle 4: Anwachsen der veröffentlichten neurologischen
Impfkomplikationen nach Lyssa-Schutzimpfung mit
Gehirngewebeimpfstoffen

Jahr	Fälle	Quelle
1888	3	GONZALES (97)
1889	5	BAREGGI (97)
1905	40	REMLINGER (108)
1913	103	SIMON (128)
1920	143	PELSER (101)
1927	329	REMLINGER (109)

Schon sehr bald nach den ersten Impfungen durch PASTEUR wurden auch neurologische Komplikationen (Impflähmungen) beobachtet (Tabelle 4). MÜLLER äußerte 1908 als erster die Vermutung, die Impfschäden könnten auf einer toxischen Wirkung der injizierten artfremden Nervensubstanz beruhen. (94 , 97).

Um diesen "Paralysefaktor" des bei der Impfstoffherstellung eingesetzten Gehirngewebes auszuschalten, entwickelte HEMPT (40 , 41) seine Phenol-Ether-Vakzine (HEMPT-Vakzine). HEMPT unterzog die Gehirnschubstanz Virus fixe infizierter Kaninchen oder Schafe für vier Tage einer Etherextraktion und bewahrte das Material dann 40 Tage lang bei 4° - 6°C in phenolhaltigem Glycerin auf. Das fertige Produkt war ein sicher inaktivierter Gehirngewebeimpfstoff aus einer 10%igen Hirnsuspension und mit einem Phenolgehalt von 1%. Die Dosierung betrug fünf- bis sechsmal 4 ml subkutan an aufeinanderfolgenden Tagen oder jeden zweiten Tag, unter Umständen nach vier Wochen eine Nachinjektion (21).

Aber auch diese Vakzine, die in Mitteleuropa weit verbreitet und in der Bundesrepublik Deutschland bis 1974 für den Gebrauch beim Menschen zugelassen war, erfüllte in keiner Weise die Sicherheitsmaßstäbe, die an einen Impfstoff ad usum humanum anzulegen sind. So haben KUWERT et al. 1967 eine Studie vorgelegt, in der mittels Fragebogenaktion 24 684 zwischen 1955 und 1966 in der Bundesrepublik vorgenommene Tollwutschutzimpfungen mit der HEMPT-Vakzine ausgewertet wurden. Dabei traten zwölf schwere Neurokomplikationen auf, davon mindestens fünf Fälle mit Dauerschäden. Das entsprach einer Neurokomplikationsrate von 1 : 2057. Nach Auswertung weiterer Daten gaben LINZENMEIER und KUWERT 1969 eine Neurokomplikationsrate von 1 : 1756 an. Elektroenzephalographische Untersuchungen ergaben 1970 und 1975 (139, 77) bei 2% bzw. 9,6% der Probanden Veränderungen des Elektroenzephalogramms im Verlaufe einer Wutschutzimpfung

mit HEMPT-Vakzine. Das bedeutet, daß unter Berücksichtigung auch subklinischer Beeinträchtigungen noch häufiger (1:10 bis 1:50) mit Neurokomplikationen nach HEMPT-Vakzination gerechnet werden muß.

Heute ist bekannt, daß es sich dabei um Immunencephalomyelitiden handelt, die durch das in den Gehirnimpfstoffen enthaltene organspezifische Antigen (sog. enzephalitogenes Protein) verursacht werden. So konnten KOPROWSKI und LEBELL schon 1950 (55) im Serum von Impflingen Antikörper gegen Gehirnantigene nachweisen. KUWERT fand 1967 (60) in Seren von Kaninchen, die mit in FREUNDschem Adjuvans inkorporiertem Gehirngewebe aus der HEMPT-Vakzine intradermal geimpft worden waren, höhere Ak-Titer gegen Cerebrosidhaptene als gegen Lyssa-Virus. Das pathohistologische Korrelat der 'Impflähmungen' ist eine akute Encephalomyelitis disseminata, gekennzeichnet durch perivaskuläre Entmarkung, Markscheidenzerfall und Achsenzylinderzerstörung, perivaskuläre lymphozytäre Infiltration, Mikrogliaproliferation und unter Umständen mehr oder weniger ausgeprägte Nervenzellschädigung. Klinisch treten Fieber, Kopfschmerzen, Erbrechen, Harn- und Stuhlverhaltung und Lähmung der Beine und Arme bis hinauf zur Nackenmuskulatur auf (97). Aber auch Sensibilitätsverluste, tonisch-klonische Krampfeigung und - wie in dem Essener Fall von 1965 - Blindheit und Demenz wurden beobachtet (20).

In den zwölf von KUWERT et al. 1967 zusammengestellten Fällen blieben bei fünf Patienten dauernde Schäden zurück. Die Gesamtletalität bei schweren Impfkomplicationen wird nach PAMPUS und WAHLE (1964) mit 16,2 % bis 25 % angegeben, über einen Fall mit tödlichem Ausgang in Deutschland berichtete JANSSEN 1970.

Neben der schweren Belastung durch z.T. tödliche oder mit bleibenden neurologischen Ausfällen verbundene Kompli-

kationen ist die virusspezifische Antigenität der HEMPT-Vakzine gering und ihre Immunogenität umstritten. Für die geringe Antigenität der HEMPT-Vakzine spricht u.a., daß KUWERT 1967 (60) nach drei Vakzinedosen nur bei 1 von 15 und nach sieben Vakzinedosen nur bei 1 von 4 Probanden neutralisierende Tollwut-Antikörper nachweisen konnte. Ein Patient war selbst nach 29 Dosen (116 ml Impfstoff) noch Ak-negativ. Versuchshunde erwiesen sich nur bei HEMPT-Vakzination vor Belastungsinfektion (also im prä-infektionellen Versuchsansatz) als z.T. geschützt, während im post-infektionellen Versuchsansatz (also unter Simulation der Wutschutzbehandlung beim Menschen) der Anteil der Versuchshunde, die eine Tollwuterkrankung nach Testinfektion entwickelten, unverändert bei 60% lag (60). KUWERT wies 1978 (72) nochmals darauf hin, daß die Wirksamkeit der aktiven postexpositionellen Tollwutprophylaxe mit Gehirnimpfstoffen beim Menschen niemals eindeutig bestätigt wurde. Von den 49 in Deutschland zwischen 1950 und 1976 an Tollwut Verstorbenen waren wenigstens 18 mit Gehirngewebeimpfstoffen (17 x HEMPT, 1 x SEMPLÉ) postexpositionell vakziniert worden (76). Allein 1965 versagte die postexpositionelle HEMPT-Vakzination bei drei der vier aufgetretenen Tollwutfälle (3).

Während in Westeuropa und Nordamerika die wenig wirksamen und hochgradig reaktogenen Gehirngewebeimpfstoffe vollständig durch deren Nachfolger - Entenembryo- und Gewebekulturvakzinen - verdrängt wurden, kommen diese in Ländern Afrikas, Asiens und Lateinamerikas mit hoher Tollwutinzidenz noch immer in großem Maße zur Anwendung. ROUMIANTZEFF et al. bezifferten 1985 den Anteil aller Tollwutimpfungen, die mit Gewebekulturvakzinen durchgeführt werden, für Afrika auf 15 %, für Süd-Ost-Asien auf 3 % und für Lateinamerika auf nur 0,3 % (112). Allein in Indien werden jährlich noch mindestens 40 Mio. Dosen inaktivierter Gehirngewebeimpfstoff in der postexpositionellen Prophylaxe beim Menschen eingesetzt (124).

E. Enteneivakzine und Impfstoffe aus Gewebekulturen

Als einen Tollwutimpfstoff, der kein Nervengewebe mehr enthielt, stellten PECK et al. 1955 ihre Enteneivakzine (Duck Embryo Vaccine - DEV) vor. Dieser Impfstoff war möglich geworden, nachdem POWELL und CULBERTSON (1950) den TWV-Stamm HEP-Flury in embryonierten Enteneiern mit ausreichenden Virustitern anzüchten konnten. Diesen Erfolgen vorausgehende Ansätze mit der Virusanzüchtung in Hühnereiern (54) führten nicht zu ausreichenden Virustitern und einer zu geringen Antigenität der daraus gewonnenen Vakzine (54).

Für die Herstellung der in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzten Enteneivakzine "Berna" des Schweizerischen Serum- und Impfinstituts in Bern wird CVS-Tollwutvirus in embryonierten Enteneiern gezüchtet und mit Betapropiolacton inaktiviert. Nach Zusatz von Thiomersal (0,01 %) wird der Impfstoff als 10%ige Entenembryosuspension lyophilisiert vertrieben (65).

Aufgrund der immer noch recht niedrigen Antigenität, müssen bei der DEV mindestens 14 tägliche subkutane Injektionen paraumbilikal durchgeführt werden (22). Dabei treten in einem hohen Prozentsatz der Fälle - HATTWICK et al. nennen 1976 68 % (39) - schmerzhaft örtliche Unverträglichkeitsreaktionen auf (Rötung, Schwellung und Schmerzen), die in Einzelfällen den Abbruch der Impfserie erforderlich machen. Die niedrige Antigenität äußert sich auch in einer erheblichen Reduzierung der Immunantwort auf DEV bei simultaner Applikation von Antitollwutserum oder RIGH. So konnten HATTWICK et al. 1976 zeigen, daß eine "adäquate" Immunantwort - Ak-Titer von mindestens 1:5 (MNT) oder 1:16 (REFIT) - nach 14 Dosen DEV bei 92 % der Probanden (n=65) auftrat, während bei gleichzeitiger Gabe von Antitollwutserum und DEV erst nach 23 Dosen DEV in 80 % der Fälle (n=51) eine "adäquate" Ak-Antwort beobachtet wurde. Bei Einsatz von

RIGH wiesen nach 23 Dosen DEV 90 % der 30 Patienten eine "ädaquate" Immunantwort auf (39).

Leider treten entgegen zunächst gehegter Erwartungen auch nach DEV-Gabe Encephalomyelitiden auf. MAC FARLANE und CULBERTSON wiesen 1954 nach tierexperimentellen Arbeiten auf die potentielle Encephalitogenität der Enteneivakzine hin (83). 1961 wurde dann über die erste allergische Encephalomyelitis nach DEV-Gabe beim Menschen berichtet (113). Insgesamt wird die Neurokomplikationsrate für die Enteneivakzine mit 1:25 000 angegeben (113). Über zwei derartige Fälle in der Bundesrepublik Deutschland berichtete SCHLENSKA 1976 (115).

Die Einführung der DEV bedeutete zwar einen Fortschritt gegenüber älteren Hirngewebeimpfstoffen, die dennoch beobachteten Neurokomplikationen zusammen mit der geringen Antigenität und den damit verbundenen, belastenden, lokalen Nebenwirkungen durch Fremdantigenität und häufige Applikationen führen dazu, daß auch die DEV nicht den Anforderungen genügt, die an eine moderne Virusvakzine ad usum humanum gestellt werden müssen.

Voraussetzungen für die Entwicklung von gehirngewebefreien Tollwutvakzinen zellkulturellen Ursprungs waren

- a) die Züchtung von Virus fixe in primären oder permanenten nicht-neuralen Zellkulturen mit ausreichend hohen Virustitern,
- b) schonende Reinigungs- und Anreicherungsverfahren für die krude Virussuspension unter Erhaltung ihrer antigenen Eigenschaften und
- c) praktikable und reproduzierbare Quantifizierungsverfahren des erreichten Virusgehaltes für Verfahrenskontrollen und zur Dosisbestimmung.

1958 konnte KISSLING den TWV-Stamm CVS und Straßenvirus an primäre Hamsternierenzellkulturen adaptieren (53). In den Jahren 1962 und 1963 erreichten WIKTOR, FERNANDES und KOPROWSKI durch Anwendung der "cell-mixing"-Technik die Anpassung verschiedener TWV-Stämme, darunter der ursprünglich 1882 von PASTEUR isolierte Stamm Pitmann-Moore (PM), an die auf embryonale humane Lungenfibroblasten zurückgehende diploide Zelllinie Wistar-38 (WI-38) (144). Daneben wurde TWV u.a. auch an primäre Zellkulturen aus fetalen Kälbernieren, Hundenieren, Hühner- und Wachtel-embryonen, an permanente diploide Zelllinien humanen und animalen Ursprungs sowie die heteroploide Vero-Zelllinie adaptiert (nach ROUMIANTZEFF et al., 1985).

SOKOL et al. publizierten 1968 ein (s.w.o.) Verfahren zur Reinigung des aus Zellkulturen stammenden TWV, das Zinkazetat-Präzipitation, Sephadexfiltration, Ultra- und Gradientenzentrifugation einschließt (131a).

Zwei Virusquantifizierungsmethoden, die schneller durchgeführt werden können als die Titration im Versuchstier und auch für diejenigen TWV-Stämme anwendbar sind, die nicht oder nur wenig virulent sind, wurden 1967 und 1968 beschrieben. SEDWICK et al. entwickelten einen Plaque-Assay für Tollwut- und andere RNS-Viren, bei dem fluoreszierende Foci oder Plaques in BHK-Zellen in Agarosesuspension ausgezählt werden (123), und KUWERT und Mitarbeiter (1968) bestimmten Virusquantitäten als hämagglutinierende Einheiten pro Milliliter (HAU/ml) (61).

Im folgenden soll nur auf die beiden zur Zeit (März 1986) in der Bundesrepublik Deutschland vom Bundesamt für Sera und Impfstoffe "Paul-Ehrlich-Institut" ad usum humanum zugelassenen Tollwutgewebekulturimpfstoffe näher eingegangen werden: Human Diploid Cell Strain (HDGS)-Vakzine (Hersteller für die Bundesrepublik: Institut Mérieux/Lyon und

Behringwerke AG/Marburg) und Purified Chick Embryo Cell (PCEC)-Vakzine (Behringwerke AG/Marburg). Daneben kommen zur Zeit (1985) zur Tollwutimpfung beim Menschen auch folgende andere Gewebekulturimpfstoffe zur Anwendung (Ursprungsland): Hamster Kidney Cell (HKC)-Vakzine (UdSSR, China), Dog Kidney Cell (DKC)-Vakzine (Niederlande), Foetal Calf Kidney Cell (FCKC)-Vakzine (Frankreich) und Purified Vero Rabies (PVR)-Vakzine (Frankreich) (112).

Nachdem es WIKTOR et al. 1964 gelungen war, TWV in HDC-Kulturen anzuzüchten (144), konnten WIKTOR und KOPROWSKI 1965 über die erfolgreiche Immunisierung von Primaten mit einer kruden, ungereinigten HDCS-Gewebekulturvakzine berichten (145). WIKTOR et al. (1969) untersuchten dann Immunogenität und Schutzkraft hochgereinigter und konzentrierter Gewebekulturvakzinen aus den TWV-Stämmen HEP-Flury und Pitman-Moore und konnten zeigen, daß derartige Versuchsimpfstoffe im "National-Institutes-of-Health- (NIH-) Potency-Test" 30- bis 100mal so wirksam wie die Referenzvakzine aus Gehirnmateriel waren (147). Die bis dahin erzielten tierexperimentellen Ergebnisse mit der HDCS-Vakzine haben SIKES et al. (127) und WIKTOR (148) 1971 zusammengestellt. Über die erste HDCS-Vakzine-Applikation beim Menschen haben WIKTOR et al. 1973 berichtet. Sie gaben HDCS-Vakzine insgesamt 16 freiwilligen Probanden, Mitarbeiter des Wistar-Instituts, Philadelphia, darunter acht zuvor nicht tollwutgeimpfte Personen und acht, für die die HDCS-Gabe eine Boosterimpfung darstellte (149).

Es folgten umfangreiche klinische Erprobungen des Impfstoffes mit verschiedenen für den prä- und postexpositionellen Gebrauch bestimmten Dosierungsschemata in den Vereinigten Staaten (25, 103, 104), Frankreich (133, 2), Iran (12) und der Bundesrepublik Deutschland (68, 69, 70, 71). Ab 1973 stand die vom Institut Mérieux/Lyon produzierte

HDCS-Vakzine auch in größerem Umfang für die Anwendung am Menschen zur Verfügung, 1976 kam ein vergleichbares Produkt der Behringwerke AG/Marburg hinzu. Die Bundesrepublik Deutschland war dann 1977 das erste Land, in dem die HDCS-Tollwutvakzine von den Gesundheitsbehörden für den prä- und postexpositionellen Gebrauch beim Menschen zugelassen wurde (22). 1983 konnten KUWERT et al. (75) von weltweit etwa 533.000 Patienten berichten, die insgesamt etwa 2,4 Mio. Dosen HDCS-Vakzine aus dem Institut Mérieux/Lyon oder den Behringwerken AG/Marburg erhalten hatten (75).

Bei der Herstellung der Mérieux-Vakzine wird der plaquegereinigte TWV-Stamm Pitman Moore PM 38 1503-3M auf der humanen diploiden Zelllinie MRC-5 (Medical Research Council) gezüchtet. Der virushaltige Zellkulturüberstand wird durch niedertourige Zentrifugation von größeren Zellpartikeln abgetrennt und mit Beta-Propiolacton (1:4000) inaktiviert, zunächst 24 h bei + 4°C, dann 2,5 h bei + 37°C. Die so hergestellte Vakzine wird durch Ultrafiltration 10- bis 20fach konzentriert. Die einzelne Dosis enthält etwa $10^{8,0}$ bis $10^{8,5}$ inaktivierte Virionen und wird in lyophilisierter Form vertrieben. Der Antigenic Value, gemessen im NIH-Test, beträgt mindestens 2,5 IU/Dosis (69, 142). Die von den Behringwerken AG/Marburg produzierte HDCS-Vakzine Rabivac^R unterscheidet sich von dem Mérieux-Impfstoff durch ein anderes Reinigungs- und Konzentrationsverfahren. Und zwar erfolgt die Reinigung und Konzentration der kruden Virus-suspension mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation im geschlossenen System (43). Dabei bandet das Virus isopyknisch bei einer Sucrosekonzentration von 37 % und die meisten Verunreinigungen werden durch den ausfließenden Überstand eliminiert (84).

Die Applikationsschemata sind für beide HDCS-Impfstoffe gleich. Sie sind für die Bundesrepublik postexpositionell jeweils eine 1 ml-Dosis an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90

nach Exposition (Essener Schema) und präexpositionell drei 1 ml-Dosen an den Tagen 0, 28 und 56 oder 0, 7, 21 (23). Postexpositionell empfiehlt das BGA bei schwerer Exposition zusätzlich zur ersten Vakzination die Verabreichung von 20 I.E. RIGH/kg KGW, möglichst jeweils zur Hälfte lokal um die Bißstelle und intramuskulär (23).

KUWERT und Mitarbeiter veröffentlichten 1976 Versuchsergebnisse zur Antikörperinduktion, die nach Immunisierung von 89 Personen mit HDCS-Vakzine (Mérieux) erzielt wurden. Alle Impflinge, die zwischen drei und sechs Dosen erhalten hatten, entwickelten hohe Titer komplementbindender und/oder neutralisierender (MNT) Antikörper. Die Antikörper wurden bei einigen Probanden schon am Tag 7 nach nur einer Impfstoffdosis nachgewiesen, traten jedoch regelmäßig am Tag 14 nach zwei (42 von 46 Impflingen) bzw. drei HDCS-Vakzine-Dosen (29 von 30 Impflingen) auf. Die höchsten Antikörpertiter lagen zwischen 1:800 und 1:2000 (28,5 - 71,5 IU/ml) und traten nach drei bis fünf Impfinjektionen auf (68).

BAHMANYAR (1974) setzte 50 I.U. heterologes Antitollwutserum pro kg KGW bei 10 Probanden am Tag 0 einer HDCS-Impfserie aus vier Injektionen ein. Er ermittelte deutlich niedrigere mittlere Ak-Titer als ohne Serumverabreichung bei ansonsten identischem Impfschema (11). KUWERT et al. untersuchten den Einfluß von homologem Tollwutimmunglobulin (RIGH) auf die Antikörperinduktion durch HDCS-Vakzine und fanden keine Unterschiede in den Antikörpertitern, wenn die Impfungen an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90 erfolgten (71,72).

Daten zum Schutz vor Tollwut nach Exposition durch nachgewiesenermaßen tollwütige Tiere haben BAHMANYAR et al. (1976) und KUWERT und Mitarbeiter (1978) vorgelegt (12 , 70). BAHMANYAR et al. behandelten 45 Patienten nach Biß durch insgesamt acht nachweislich tollwütige Hunde und Wölfe mit

6 Dosen HDCS-Impfstoff und 40 I.U. Antitollwutserum/kg KGW. Kein Fall von Tollwut trat auf, während üblicherweise im Iran mit einer Erkrankungsrate von 35 % nach derartiger Exposition zu rechnen war (12). KUWERT et al. führten insgesamt 326 post-expositionelle HDCS-Impfungen durch, unter denen 68 Fälle mit gesicherter Lyssadiagnose beim Tier waren. Die Patienten wurden bis zur Veröffentlichung ein bis fünf Jahre lang beobachtet und blieben gesund (70).

KUWERT et al. gaben 1983 nach Auswertung von etwa 533.000 Tollwutimpfungen mit HDCS-Impfstoffen aus deutscher und französischer Produktion die Häufigkeit lokaler Reaktionen (Rötung, Verhärtung und Juckreiz) mit 10 % an, diejenige systemischer Reaktionen (Fieber, Kopfschmerzen, gastro-intestinale Symptome) mit 1 %. Insgesamt wurde über zwei Fälle von Neurokomplikationen (beginnendes bzw. definitives Guillain-Barré-Syndrom) im Zusammenhang mit HDCS-Impfung berichtet, ein kausaler Zusammenhang aber nicht nachgewiesen. Unter der Annahme der Impfung als Ursache für die beiden neurologischen Komplikationen ergibt sich eine "Neurokomplikationsrate" für die HDCS-Vakzine von weniger als 1 : 260.000 (75).

Tollwut nach HDCS-Impfung trat bis 1983 nur in zwei Fällen auf. Einmal wurde trotz schwerer Exposition entgegen W.H.O.-Empfehlung auf die Gabe von Tollwutimmunglobulin verzichtet, in dem anderen Fall war nur mehrere Monate vor der Exposition 3mal 0,1 ml Vakzine intradermal gegeben worden, jedwede Behandlung nach Hundebiß unterblieb (75).

1985 faßten KUWERT und SCHEIERMANN Vor- und Nachteile der HDCS-Tollwutvakzine zusammen (74). Sie nannten an Vorteilen:

1. fehlende Kanzerogenität, Freisein von onkogener DNA oder RNA, diploider Karyotyp des eingesetzten Zellsubstrates,

2. keine Fremdantigenität,
 3. fehlende genetische Heterogenität des Zellsubstrates,
 4. Freisein von kontaminierendem Fremdvirus,
 5. Vakzineproduktion in nur einer Zellpassage
- und als Nachteil die relativ niedrige Zellteilungsrate von HDC-Kulturen.

Folgende Schwierigkeiten bei der Produktion von HDCS-Impfstoff führen zu der sehr begrenzten Zahl von Herstellern und den hohen Kosten für jede Impfstoffdosis (in der Bundesrepublik 1986 105,60 DM): geringe Virusaussbeute, lange Dauer und Risiken bei der Kultur humandiploider Zellen, notwendige Antigenkonzentration um ein Vielfaches und anspruchsvolle und langdauernde Kontrollen (112). Die Behringwerke beschrieben ihre HDCS-Produktion mit zeitraubend, schwierig und voller Risiken; Produktionskosten waren trotz wachsender Erfahrung bei der Herstellung nicht zu senken (16). Auf diesem Hintergrund wurde eine neue inaktivierte Tollwutvakzine zur Anwendung am Menschen entwickelt, die Purified Chick Embryo Cell-(PCEC-)Tollwutvakzine.

Die Virusanzüchtung für die PCEC-Vakzine erfolgt in primären Hühnerembryofibroblastenkulturen. Die als Ausgangsmaterial verwendeten embryonierten Hühnereier haben SPF-Qualität (spezifiziert pathogenfrei) oder stammen aus kontrollierten gesunden Herden (17).

Das Impfvirus, der vom "WHO Expert Committee on Rabies" zur Vakzineherstellung empfohlene TWV-Stamm Flury LEP, hat folgende Vorgeschichte: 60 Passagen in Hühnerembryonen, 90 Passagen in primären Hamsternierenfibroblastenkulturen, 12 Passagen in HDCS-Wi-38-Kulturen und 25 Passagen in primären Hühnerembryofibroblasten. Der so erhaltene Virusstamm wird als Flury-LEP-C25 bezeichnet (16).

Bei der Herstellung wird die krude Virussuspension durch Membranfiltration von Zelltrümmern gereinigt und mit Betapropiolacton (0,025 %) inaktiviert. Das inaktivierte Antigen wird durch kontinuierliche Dichtegradienten-ultrazentrifugation (43) gereinigt und konzentriert und anschließend bei - 70° C gelagert. Nach Bestimmung der relativen Wertigkeit in einem modifizierten Antikörperbindungstest (14 , 15) wird das konzentrierte Ag unter Stabilisatorzusatz auf einen Antigenic Value von mindestens 2,5 IU eingestellt und lyophilisiert in 1 ml-Dosen vertrieben (17). Die Herstellung erfüllt die Anforderungen der "WHO Requirements for Rabies Vaccine für Human Use" (152).

Laborergebnisse, die mit der PCEC-Vakzine vor der klinischen Prüfung erzielt wurden, veröffentlichten BARTH et al. 1984 (16). Überprüft wurden das Freisein von Restproteinen aus der Hühnerzellkultur, lokale und systemische Verträglichkeit, Pyrogenität, Antigenität, Schutzkraft und Interferoninduktion. Weder mit der Agargelpräzipitation noch durch In-vivo-Allergisierungsversuche am Meerschweinchen konnten Restproteine aus der CEC-Kultur in den Vakzinechargen nachgewiesen werden. Die lokale und systemische Verträglichkeit der PCEC-Vakzine wurde an Beagle-Hunden (klinisch und pathologisch-anatomisch) und Cynomolgusaffen (klinisch) aufgezeigt. Das Freisein von Pyrogenen wurde nach der Europäischen Pharmakopoe an Kaninchen nachgewiesen. Eine starke Antikörperinduktion durch PCEC-Impfstoff trat in Mäusen, Meerschweinchen und Cynomolgusaffen auf. Die Versuche, die vergleichend mit zwei Chargen HDGS-Vakzine ähnlicher relativer Wertigkeit durchgeführt wurden, ergaben für beide Vakzinen eine 100% Serokonversionsrate bei allen Versuchstierarten. Für die PCEC-Vakzine ergaben sich höhere Ak-Werte bei Mäusen, wenn sie nur einmal vakziniert worden waren (Antikörperinduktionstest, modifiziert nach ROSANOFF). Die HDGS-Vakzine führte dagegen zu höheren Ak-

Werten am Tag 30 sowohl nach einmaliger Applikation am Tag 0, als auch im Rahmen eines vollständigen post-expositionellen Impfschemas. Am Tag 7 traten jedoch keine Unterschiede der Antikörperwerte zwischen PCEC- und HDCS-Impfstoff auf, in beiden Gruppen waren 7 Tage nach nur einer Vakzinegabe bei allen Affen neutralisierende Serum-Ak nachzuweisen. Belastungsversuche an Meerschweinchen und Mäusen im prä-expositionellen Versuchsansatz erbrachten ähnliche Ergebnisse für beide Impfstoffe im Test. Zum ersten Mal wurde auch im post-expositionellen Versuchsansatz (erste Vakzination 3 h nach i.m.-CVS-Virusinokulation) eine Schutzwirkung sowohl der PCEC-Vakzine (6 von 10 Tieren geschützt) als auch der HDCS-Vakzine (7 von 10 Tieren geschützt) nachgewiesen. Interferoninduktion trat bei allen 12 Cynomolgusaffen auf, die 24 h zuvor eine Dosis PCEC-Impfstoff erhalten hatten (bis zu 12,0 IU/ml Serum), während nur 4 von 12 HDCS-vakzinierten Tieren niedrige IF-Titer (bis zu 2,3 IU/ml) entwickelten (16).

Erste Anwendungen der neuen PCEC-Vakzine am Menschen erfolgten beim Hersteller und im europäischen und asiatischen Ausland. Die dabei erhobenen Befunde wurden 1984 auf einem Symposium in Dubrovnik vorgestellt (142). Interferoninduktion nach PCECV-Gabe konnte dabei für den Menschen nicht nachgewiesen werden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Vakzine, Probanden, Material und Methoden

1. Vakzine

Zum Einsatz kam die Purified Chick Embryo Cell-Vakzine (PCECV) der Behringwerke AG/Marburg, Charge 516016. Die Charge hatte einen Antigenwert (Antigenic Value) von 8,7 IU/Dosis (gemessen im NIH-Test) bzw. 8,4 IU/Dosis (gemessen im AB-Test) (Mitteilung der Behringwerke). Der lyophilisierte Impfstoff wurde bei + 4°C bis + 6°C gelagert und unmittelbar vor Anwendung in 1 ml Aqua ad injectabilia (Ch.-B.: 110717) je Dosis resuspendiert.

2. Probanden, Impfungen und Blutentnahmen

Zwischen Februar und Mai 1985 wurden insgesamt 88 freiwillige Probanden, 40 Frauen und 48 Männer, nach sechs verschiedenen Schemata vakziniert. Die Probanden waren zwischen 21 und 38 Jahren alt, das Durchschnittsalter betrug 25,6 Jahre. Injektionen von 1 ml PCEC-Impfstoff in den M. deltoideus erfolgten in den einzelnen Gruppen nach den Schemata, die in der Tabelle 5 aufgeführt sind. Die Probanden in Gruppe V erhielten am Tag 0 die dreifache Dosis der PCEC-Vakzine intramuskulär auf zwei Körperstellen verteilt. Entnahme von jeweils 10 ml Vollblut erfolgte in den Gruppen I - IV an den Tagen 0, 7, 14, 30, 90, 120 und 180 nach Erstimpfung, in den Gruppen V und VI trat der Tag 21 an die Stelle des Tages 30. Bei den Probanden der Gruppen V und VI wurden außerdem 0, 7, 20, 24 und 30 Stunden nach Erstimpfung Blutproben ent-

nommen. Das Blut wurde ohne Zusätze zentrifugiert

Tabelle 5: Impfschemata

Gruppe	n	Impfungen an den Tagen					
I	15	0	3	7	14	30	90
II	19	0		7	14	30	90
III	14	0	3	7	14	30	
IV	19	0		7	14	30	
V	10	0 (3x)		7		21	
VI	11	0 (1x)		7		21	

und das so gewonnene Serum bei - 20°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

3. Erfassung der Reaktogenität des PCEC-Impfstoffes

3.1 Fragebogenaktion

Jeder Impfling erhielt zu jeder Impfung einen Fragebogen (siehe Anhang), in dem lokale und allgemeine Nebenwirkungen über einen Zeitraum von 3 Tagen abgefragt wurden. Eine Überprüfung der angegebenen Symptomatik durch den Impfarzt erfolgte nicht.

3.2 Radio Allergo Sorbens Test

Aliquots der Seren vom Tag 30 für die Gruppen I-IV und vom Tag 90 für die Gruppen V und VI wurden im Radio Allergo Sorbens Test (Phadebas RAST^R - Pharmacia Diagnostics) auf das Vorhandensein von allergen-spezifischen IgE-Antikörpern gegen Hühnereiweiß untersucht. Bei der Durchführung des RAST

wurden folgende Substanzen verwandt (102):

- a) an Papierscheiben kovalent gekoppeltes Hühnereiweiß-allergen aus frischem Hühnereiweiß,
- b) Referenzscheiben, an Papierscheiben kovalent gekoppeltes Referenz-Allergen. Als Referenz-Allergen wird von der Firma Pharmacia ein Birkenpollenpräparat eingesetzt.
- c) Referenzserum A aus einem standardisierten Humanserum-pool mit einer hohen Konzentration an spezifischem IgE gegen das Referenz-Allergen Birke, kalibriert gegen den 1. Britischen Standard 75/502 für humanes Serumimmunglobulin E,
- d) Referenzserum B, eine 1:5-Verdünnung des Referenzserums A in einem Serumpool ohne Antikörper gegen das Referenz-Allergen,
- e) Referenzserum C, eine 1:25-Verdünnung des Referenzserums A in einem Serumpool ohne Antikörper gegen das Referenz-Allergen,
- f) Referenzserum D, eine 1:50-Verdünnung des Referenzserums A in einem Serumpool ohne Antikörper gegen das Referenz-Allergen,
- g) Anti-IgE-¹²⁵I-Lösung (vom Kaninchen),
- h) Waschlösung, hergestellt durch Hinzufügen von durch die Firma Pharmacia bezogenem testeigenen Waschlösungszusatz zu 6 l physiologischer NaCl-Lösung.

In Polystyrol-Teströhrchen (Ø 12 x 55 mm, mit Rundboden) wurde je eine Papierscheibe mit Hühnereiweißallergen hineingelegt und 50 µl Probandenserum hinzupipettiert. Acht weitere Teströhrchen wurden mit je einer Referenzscheibe beschickt und in jeweils zwei dieser acht Röhrchen wurden je 50 µl einer der Referenzseren A bis D pipettiert. Alle Röhrchen wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Röhrchen 3mal mit je 2,5 ml Waschlösung gewaschen. Nach vollständi-

gem Absaugen der Waschlösung wurde in jedes Röhrchen 50 µl Anti-IgE-¹²⁵J-Lösung pipettiert. Zwei weitere Röhrchen wurden ebenfalls mit je 50 µl Anti-IgE-¹²⁵J-Lösung beschickt und sofort verstöpselt. Alle übrigen Teströhrchen wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am anderen Tag wurden alle Röhrchen mit Ausnahme der beiden zuletzt nur mit Anti-IgE-¹²⁵J-Lösung beschickten wiederum dreimal mit je 2,5 ml Waschlösung gewaschen. Die Waschlösung wurde vollständig abgesaugt und die Röhrchen verstöpselt. Die Gesamtaktivität der Anti-IgE-¹²⁵J-Lösung und die gebundene ¹²⁵J-Aktivität wurden mit dem Packard 5412 Chrystal Multidetector Manual Gamma Counting System (United Technologies Packard) gemessen. Die Auswertung erfolgte durch einen integrierten Rechner. Dabei wird die für jede Probe gemessene gebundene Aktivität mit den durch die vier Referenzseren gebundenen Aktivitäten verglichen und jede Serumprobe in eine von fünf RAST-Klassen (0-4) eingeordnet. RAST-Klassen-Werte unter 1 bedeuten, daß in der Probe allergenspezifische IgE-Antikörper nicht vorhanden oder nicht nachweisbar sind.

4. Erfassung der Immunogenität des PCEC-Impfstoffes

Serumantikörper gegen das Tollwutvirus wurden mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (KBR) und des Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) bestimmt.

4.1 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die Komplementbindungsreaktion wurde als Mikro-KBR nach der von KUWERT 1973 beschriebenen Methode durchgeführt (66).

Bei der Durchführung der KBR wurden folgende Materialien eingesetzt:

- a) Veronalpuffer nach MAYER (85), pH 7,2, Rezeptur siehe Anhang 2, S. 121.
- b) Hämoglobin-Transformationslösung, Rezeptur siehe Anhang 3, S. 122.
- c) Hammelerythrozytensuspension in einer Konzentration von $0,7 \times 10^9$ pro ml.

Zu ihrer Herstellung wurden von der Firma Dr. Koch/ Dr. Merck, Ochsenhausen als 50%ige Suspension bezogene Hammelerythrozyten 3mal in Veronalpuffer gewaschen. Nach Abzentrifugieren des Waschpuffers wurde eine 1%ige Hammelerythrozytensuspension in Veronalpuffer hergestellt. 0,75 ml dieser 1%igen Suspension wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, anschließend wurde 1,25 ml Hämoglobin-Transformationslösung hinzugefügt und die Extinktion durch das entstandene Hämiglobincyanid bei 546 nm im Photometer bestimmt. Nach der Formel

$$V_f = V_i \frac{o.D.}{0,4}$$

mit V_f = einzustellendes Volumen,

V_i = vorhandenes Volumen und

o.D. = gemessene Extinktion

wurde durch Hinzufügen von Veronalpuffer jeweils eine Hammelerythrozytenkonzentration eingestellt, die einer Extinktion von 0,4 entsprach.

- d) Ambozeptor

Der Ambozeptor stammte von einem mit Hammelerythrozyten immunisierten Kaninchen. Das Kaninchenserum wurde

bei + 56°C für 30 Min. inaktiviert und 1 : 100 mit Veronalpuffer vorverdünnt. Der 50%-Wert der hämolytischen Antikörper des Kaninchenserums (AkH_{50}) betrug 1 : 80.000. Im Test wurden 10 AkH_{50} (1 Teil 1 : 100-Verdünnung des Serums + 79 Teile Veronalpuffer) eingesetzt.

e) Komplement

Komplement stand als bei - 70°C gelagertes Meerschweinchen-Normalserum zur Verfügung. Mit jedem Testansatz wurde eine Komplementauswertung durchgeführt und die höchste Komplementverdünnung bestimmt, bei der noch gleiche Teile eines hämolytischen Systems (optische Dichte 0,2) bei + 37°C in 20 Min. vollständig hämolysiert wurden. Eine um den Faktor 3 niedrigere Meerschweinchen-serumverdünnung wurde im Test eingesetzt.

f) Tollwut-Antigen

Das komplementbindende Antigen wurde hergestellt durch Vermehrung des TWV-Stammes Flury LEP in Hühnerembryofibroblasten und anschließender Konzentration und Reinigung mittels kontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation. Es wurde freundlicherweise von den Behringwerken zur Verfügung gestellt und hatte einen Antigenwert (Antigenic Value) von 113 IU/ml, gemessen im Antibody Binding Test.

Die Blocktitration der Ag-Präparation mit einem bekannten humanen Antitollwutserum und der dreifachen $C'H_{50}$ -Dosis ($C'H_{50}$ = die zur Erreichung einer 50%igen Hämolysenotwendige Menge an Komplement) erbrachte eine Antigen- $C'H_{50}$ von 1 : 600 (Antigen- $C'H_{50}$ = diejenige Antigenmenge, bei der gerade 50 % der im Reaktionsansatz vorhandenen sensibilisierten Schafererythrozyten lysiert werden). Im Test wurde eine 1 : 120-Verdünnung des TWV-Ag eingesetzt.

g) Positives Serum

Als Positivkontrolle diente ein bekanntes komplementbindendes Antitollwutserum von einem Patienten nach Immunisierung mit HDCS-Impfstoff.

h) Negatives Serum

Als Negativkontrolle wurde ein menschliches Normalserum einer Person ohne TW-Impfanamnese in jedem Testansatz mituntersucht.

Nach 30minütiger Inaktivierung bei + 56°C wurden die Serumproben 1:8 in Veronalpuffer vorverdünnt. Die Mulden der ersten Reihe einer PS-Mikrotiterplatte, U-Form, der Firma Greiner wurden mit den 1:8-Verdünnungen der Probandenserum beschickt, und zwar je zwei Mulden mit je 50 µl eines 1:8 vorverdünnten Serums. Alle übrigen Mulden wurden mittels einer automatischen Pipettiervorrichtung der Firma Flow-Laboratories, Bonn mit 25 µl Veronalpuffer beschickt. Mit Hilfe des Mikrodiluters Rotatiter der Firma Dynatech wurden 1:2-Verdünnungsreihen der vorverdünnten Seren in Veronalpuffer hergestellt. Jedes Probandenserum wurde also zweimal in 2er Schritten bis 1:1024 verdünnt. Zu einer der beiden Verdünnungsreihen wurde dann je Mulde 25 µl TW-Antigen (1:120 in Veronalpuffer verdünnt) und zu beiden Verdünnungsreihen je Mulde 25 µl der für den jeweiligen Ansatz ermittelten Komplementverdünnung mittels Tropfpipette hinzugefügt. Insgesamt kamen Komplementverdünnungen zwischen 1:65 und 1:120 zum Einsatz.

An Kontrollen wurden angesetzt:

- a) eine Verdünnungsreihe jeden Probandenserums in Veronalpuffer mit Komplement, aber ohne TWV-Antigen,
- b) ein bekanntes menschliches Positivserum,
- c) ein bekanntes menschliches Normalserum,
- d) zweimal 25 µl TW-Antigen und Komplement ohne Serum,

- e) zweimal 25 µl TW-Antigen ohne Komplement und Serum,
- f) zweimal 25 µl Komplement ohne weitere Zusätze.

Die Mikrotiterplatten wurden dann für 18 Std. bei + 4°C inkubiert.

Zur Vorbereitung des hämolytischen Systems (=sensibilisierte Erythrozyten) wurde die auf eine optische Dichte von 0,4 eingestellte Hammelerythrozytensuspension zu gleichen Teilen mit Ambozeptorgebrauchsverdünnung vermischt und eine Stunde im + 37°C-Wasserbad inkubiert.

In alle Mulden wurden nach 18 Stunden 50 µl hämolytisches System pipettiert, die Platten wurden mit Haftfolie verschlossen und 30 Min. lang in der 37°C-Wärmekammer inkubiert.

Die Ablesung der Platten erfolgte mit Hilfe eines Mikrotitervergrößerungsspiegels, und der Grad der Komplementbindung wurde nach dem folgenden Schema in sechs Klassen eingeteilt:

Blutkörperchen ungelöst	++++
Blutkörperchen fast ungelöst	+++
Blutkörperchen zu etwa $\frac{1}{2}$ gelöst	++
Blutkörperchen zu etwa $\frac{3}{4}$ gelöst	+
Blutkörperchen zu mehr als $\frac{3}{4}$ gelöst (sog. Schleier)	+/-
Blutkörperchen völlig gelöst, klare, lackfarbene Flüssigkeit	-

Als komplementbindender TW-Ak-Titer wurde die höchste Serumverdünnungsstufe angegeben, die noch mindestens mit "++" bewertet wurde.

4.2 Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test

Der Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (SMITH et al., 1973) wurde in der von ZALAN et al. (1979) modifizierten Form in Zellkulturmikrotiterplatten der Firma Greiner durchgeführt.

Für den RFFIT wurden folgende Materialien verwandt:

a) Zelllinie

Die Zelllinie BHK 21-A69 stammte aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, und war bis Testbeginn 70mal im Essener Institut passagiert worden. Die im Test eingesetzte Zellsuspension hatte eine Zelldichte von 480.000/ml.

b) Virus

Als Challengevirus diente CVS-Tollwutvirus. Der Virusstamm war vom Statens Seruminstitut in Kopenhagen bezogen worden und 15mal im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Frankfurt und 8mal im Essener Institut auf BHK-21-Zellen passagiert worden. Die 8. Passage hatte bei i.c.-Inokulation einen mittleren Titer von $10^{6,8}$ Mäuse-LD₅₀/0,03 ml (57).

c) Tollwut-Serum vom Pferd, Behringwerke B 215 005

Das Serum stammte von Pferden, die mit dem TWV-Stamm PASTEUR Virus 11 (PV-11) immunisiert worden waren. Der Ak-Gehalt des Serums wurde gegen den TWV-Stamm CVS im Vergleich mit dem nationalen Tollwut-Serumstandard WS 3 (Wutschutz 3, vertrieben durch das Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Frankfurt) bestimmt und betrug 475 I.E./ml. Das Serum wurde freundlicherweise von den Behringwerken zur Verfügung gestellt.

- d) Zellwachstumsmedium, Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen, Rezeptur siehe Anhang 4, S. 122.
- e) Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca^{++} und Mg^{++} nach DULBECCO und VOGT (47), pH 7,3.
- f) 50%ige Glycerinlösung in PBS, durch Zugabe von NaOH auf einen pH-Wert zwischen 8,0 und 9,0 eingestellt.
- g) 0,1%ige DEAE-Dextran-Gebrauchslösung
Eine 1%ige Stammlösung von DEAE-Dextran in Aqua bidest. wurde bei + 4°C aufbewahrt und für jeden Testansatz 1 : 10 in Zellwachstumsmedium verdünnt.
- h) Anti-Tollwut-Serum vom Kaninchen, Gamma-Globulin-Fraktion, fluorescein-konjugiert, Präparat der Behringwerke, Ch.-B.: 126708 A.

Das lyophilisierte Fluorescein-Konjugat wurde in 1 ml Aqua bidest. rekonstituiert, 1 : 10 in BHK-Zellsuspension verdünnt und über Nacht bei + 4°C aufbewahrt. Die Zellen wurden 10 Min. bei etwa 500 g abzentrifugiert. Aus 10 ml BHK-Suspension abzentrifugierte frische BHK-Zellen wurden in dem Fluorescein-Konjugat resuspendiert und erneut einige Stunden bei + 4°C aufbewahrt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde der Überstand zur Färbung der Zellkulturen verwandt.

- i) Hyperab^R-Cutter, Ch.-B.: 0050484

Das Anti-Tollwut-Immunglobulin vom Menschen hat nach Angaben des Herstellers einen Ak-Gehalt von 150 IU/ml, es wurde als Positivkontrolle in jedem Testansatz mitgeführt.

- k) Anti-Tollwut-Patienten-Serum

Als zweite Positivkontrolle diente ein menschliches Anti-Tollwut-Serum, das nach Immunisierung mit HDGS-Impfstoff gewonnen wurde.

1) Negatives Serum

Als Negativkontrolle wurde ein menschliches Normalserum einer Person ohne TW-Impfanamnese in jedem Testansatz mituntersucht.

Bestimmung der optimalen Virusverdünnung

Zur Festlegung einer geeigneten Verdünnung des Challenge-Virus wurde die 8. Essener Passage des CVS-Virus 10mal titriert und die Virusinfektiosität für BHK-21-Kulturen als FFD_{50} bestimmt (Mittlere (50%) Fluoreszierende Foci Dosis). Dabei wurde die höchste Virusverdünnung nach der Methode von SPEARMAN und KÄRBER bestimmt, bei der noch genau 50% der mikroskopierten Gesichtsfelder der Zellkultur fluoreszierende Foci (= TWV-infizierte Zellen) aufwiesen. Als Mittelwert aus 10 Titrationen ergab sich ein Virustiter von $10^{2,9} FFD_{50}/0,1$ ml. Es wurde eine Gebrauchsvirusverdünnung von 1:15 gewählt, so daß sich bei einer Zelleinsaat von 48.000/Kompartiment ein Virus-Input von $0,001 FFD_{50}/Zelle$ oder $53 FFD_{50}/Kompartiment$ ergab. Dieses Virus-Input führte innerhalb von 24 Stunden in allen Fällen zu einem dichten Nebeneinander fluoreszierender Foci im mikroskopischen Bild (Abb. 1).

0,1 ml Probandenserum wurden 30 Min. bei $+ 56^{\circ}C$ inaktiviert und 1:5 in Zellwachstumsmedium vorverdünnt. Je 125 μ l der 1:5-Vorverdünnungen wurden in je ein Kompartiment der ersten Reihe der Zellkulturmikrotiterplatte mittels 0,2 ml-Glaspipette eingefüllt. Alle übrigen Kompartimente wurden mittels Tropfpipette mit 100 μ l Zellwachstumsmedium beschickt. Mit dem Mikrodiluter Rotatiter der Firma Dynatech wurden dann in den Mikrotiterplatten 1:5-Verdünnungsreihen der Probandenserum bis 1:78125 (7. Reihe) hergestellt. Die Kompartimente der 8. Reihe blieben serumfrei und dienten zur Aufnahme der Viruskontrollen.

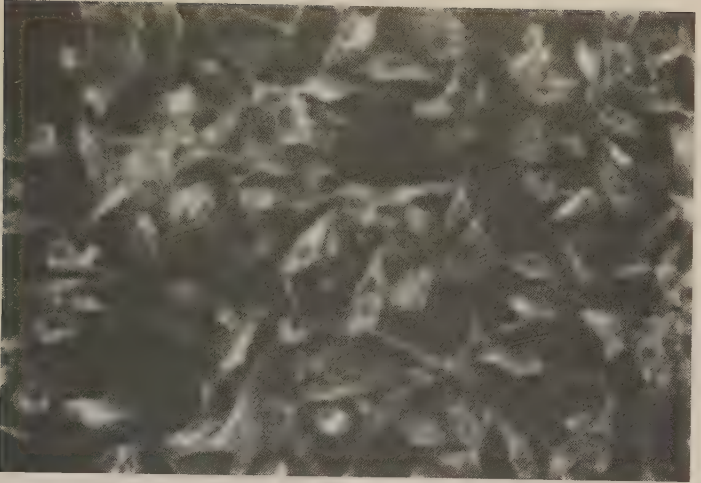


Abbildung 1 A

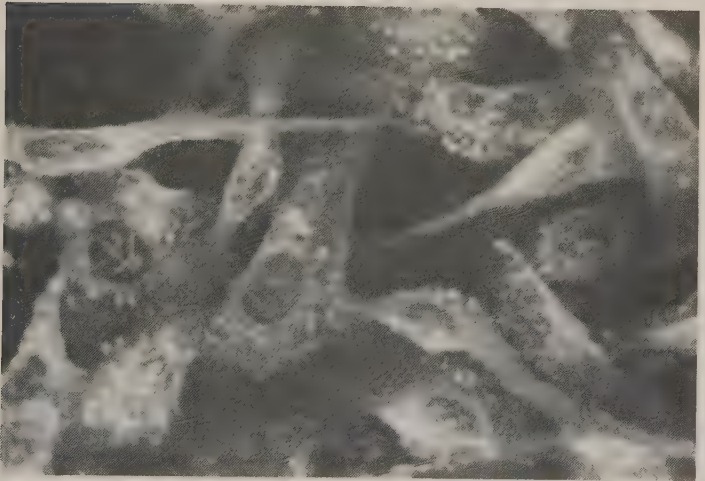


Abbildung 1 B

Abbildung 1: TWV-infizierte BHK 21-Zellkultur, gefärbt mit FITC-Kaninchenserum-Konjugat (Behring 126708 A) 24 Stunden nach Infektion der Kultur, fluoreszenzmikroskopisches Bild; A: Vergrößerung x 200, B: Vergrößerung x 480.

Außerdem wurden bei jedem Testansatz je zwei 1:5-Verdünnungsreihen des equinen Anti-Tollwut-Serums (1:10 in PBS vorverdünnt), des Hyperab^R - Cutter, des Anti-Tollwut-Patientenserums und des menschlichen Normalserums in Zellwachstumsmedium hergestellt.

Zu jeder Serumverdünnung und in die Kompartimente der 8. Mikrotiterplattenreihe wurden 100 µl Virusgebrauchsverdünnung hinzugefügt, und das Serum-Virus-Gemisch wurde 90 Min. bei + 32°C und 5 % CO₂ inkubiert.

DEAE-Dextran-Gebrauchslösung wurde im Verhältnis 1:99 zur BHK-Zellsuspension hinzugefügt und das DEAE-Dextran 10 Min. bei Zimmertemperatur auf die BHK-Zellen einwirken gelassen. Zu den Serum-Virus-Ansätzen und den Viruskontrollen wurden nach 90 Min. Inkubation 100 µl DEAE-Dextran-behandelte BHK-Suspension mittels Tropfpipette hinzugefügt. In zwei weitere Kompartimente wurden nur je 100 µl DEAE-behandelte Zellsuspension als Zellkontrolle pipettiert.

Alle Platten wurden dann 24 h bei + 32°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 24 h wurden die Zellkulturen mit 80%igem Aceton in PBS einmal 1 Min. bei + 4°C und ein zweites Mal 5 Min. bei - 20°C fixiert. Nach Lufttrocknung wurden je Mikrokultur 50 µl Fluorescein-Konjugat hineinpipettiert und die Kulturen in einer feuchten Kammer 20 Min. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte zweimaliges Waschen der Platten mit PBS (je 5 Min.) und kurzes Spülen mit Aqua bidest. Nach erneuter Lufttrocknung wurde jede Kultur mit 10 µl Glyceringebrauchslösung überschichtet. Die Platten wurden bis zum Mikroskopieren bei + 4°C aufbewahrt.

Die Platten wurden in einer um 180° gewendeten Position (Boden nach oben) mit einem Karl-Zeiss-Standard Universal-

mikroskop bei 240facher Vergrößerung mikroskopiert. Betrieben wurde die Auflichtfluoreszenz-Anregung mit einem Erregerfilter BG 12 und einem Sperrfilter 50. In jeder Serumverdünnungsstufe wurden acht zufällig gewählte Gesichtsfelder ausgewertet und als "fluoreszenz-positiv" oder "fluoreszenz-negativ" eingestuft.

Als "fluoreszenz-positiv" wurde ein Gesichtsfeld bewertet, wenn mindestens zwei aus jeweils mindestens zwei benachbarten Zellen bestehende fluoreszierende Foci in dem Gesichtsfeld aufleuchteten.

Als "fluoreszenz-negativ" wurde ein Gesichtsfeld bewertet, wenn höchstens ein fluoreszierender Focus in dem Gesichtsfeld aufleuchtete.

Nach Auszählung der fluoreszenz-negativen Gesichtsfelder in jeder Verdünnungsstufe wurde nach der SPEARMAN-KÄRBER-Formel (96) die 50%-Neutralisationsdosis (ND_{50}) für jedes Serum bestimmt. Die Umrechnung in IU/ml erfolgte durch Vergleich der Serum- ND_{50} mit dem Mittel aus den beiden in jedem Testansatz ermittelten ND_{50} des equinen Anti-Tollwut-Serums (nach ATANASIU, 1973) (6).

Die Aufteilung der Probandengruppen auf die einzelnen Versuchsansätze erfolgte in der Weise, daß in jedem Ansatz mindestens zwei Probanden aus jeder Impfgruppe vertreten waren, so daß alle Versuchsgruppen auf alle Labortage verteilt wurden und nicht eine Probandengruppe nach der anderen untersucht wurde.

5. Untersuchung der Probandenserum auf Interferon

Bei den Probanden der Gruppen V und VI wurde 0,7, 20, 24 und 30 Stunden nach der Applikation von 3 bzw. 1 ml PCEC-Vakzine der Seruminterferongehalt bestimmt. Aliquots der entsprechenden Seren wurden kodiert an Herrn Dr. J. Hilfenhaus, Behringwerke AG/Marburg, übersandt.

Die Serum-Interferon-Aktivität wurde gemessen als Hemmung der Vermehrung von Encephalomyocarditis-Virus (EMC-Virus) in menschlichen GM 2504-Zellkulturen, hinsichtlich Chromosom 21 trisomere Fibroblasten, die vom Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, N.J. bezogen wurden. In Zellkultur-Mikrotiterplatten wurden konfluierende GM 2504-Zell-Monolayer mit einer 1:2-Verdünnungsreihe (beginnend mit 1:5) der Probandenseren über Nacht inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde entfernt, EMC-Virus hinzugefügt und weitere 48 Stunden inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde entfernt und die lebenden Zellen mit Neutralrot angefärbt. Die Intensität der Färbung wurde in den Platten mit einem Titertek Multiskan Photometer (Flow Laboratories GmbH, Bonn) bei 541 nm gemessen. Es wurde diejenige Serumverdünnung ermittelt, die den cytopathischen Effekt (CPE) des EMC-Virus um 50 % reduziert und das Mittel aus drei Bestimmungen als Interferon-Titer angegeben.

Bei den Untersuchungen wurde ein interner Laborstandard für humanes Leukozyteninterferon eingesetzt und erbrachte einen Titer von 1:32000. Der interne Laborstandard war am IRP 69/19 (International Reference Preparation) kalibriert worden und wies nach mehr als zehn Vergleichstestungen einen Wert von 2000 IU/ml auf.

Die hinsichtlich Chromosom 21 trisomeren GM 2504-Zellen sind zehnmal empfindlicher gegenüber der antiviralen Aktivität von Humaninterferonen als diploide humane Zellen (TAN et al., 1973), so daß mit dem oben beschriebenen Assay 1 IU humanes Fibroblasten- oder Leukozyteninterferon pro Milliliter eindeutig bestimmt werden kann (HILFENHAUS und ACKERMANN, 1981).

6. Statistische Berechnungen

Aus den für jeden Probanden und jeden Blutentnahmetag ermittelten Titerwerten wurden für jede Probandengruppe das geometrische Titermittel nach

$$\text{GMT} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot \dots \cdot x_n}$$

und die Standardabweichung s nach

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\lg x_i)^2 - \frac{(\sum \lg x_i)^2}{n}}{n - 1}}$$

gebildet und GMT und die Schranken des Intervalls $\text{GMT} \pm s$ angegeben.

Zur Überprüfung der Signifikanz von Titermitteldifferenzen zwischen verschiedenen Gruppen wurde zunächst die Lognormalverteilung der Stichprobe mit einem Signifikanzniveau von 5 % nachgewiesen. Dies geschah für $n > 30$ mit dem Chi-Quadrat-Test und für $n \leq 30$ mit dem KOLMOGOROFF-SMIRNOFF-Test (96). Auch Varianzhomogenität konnte für alle verglichenen Probandenkollektive mit dem F-Test bei 5%-Signifikanzniveau gezeigt werden, so daß in allen Fällen der STUDENT-t-Test zur Prüfung der Mittelwertdifferenzen angewandt werden konnte (96).

Beim Vergleich der verschiedenen Impfschemata wurde zur Signifikanzprüfung der beobachteten Unterschiede hinsichtlich des relativen Anteils antikörperpositiver Probanden ebenfalls der Chi-Quadrat-Test durchgeführt (96).

B. Ergebnisse

1. Reaktogenität der PCEC-Tollwutvakzine

1.1 Fragebogenaktion

Insgesamt standen 292 beantwortete Fragebögen für die Auswertung zur Verfügung. Die Anzahl der Nennungen ist für die einzelnen Symptome im tabellarischen Anhang aufgeführt (S.108). Nach 112 Impfungen (38,4 %) traten keinerlei Nebenwirkungen auf.

Allgemeinreaktionen

Nach 91 Impfungen (31,2 %) wurden Allgemeinreaktionen genannt. Dabei verteilten sich die 91 Nennungen wie folgt auf die einzelnen vorgegebenen Symptome:

Am häufigsten (22,9 %) wurde "Müdigkeit" angegeben, es folgten "Kopfschmerzen" (13,4 %), "Schwindel" (5,1 %), "Temperaturerhöhung" (5,1 %) und "gastrointestinale Symptome" (2,7 %). Läßt man subjektiv als "mild" bewertete Allgemeinreaktionen bzw. Temperaturerhöhungen auf unter 38°C außer Betracht, so ergeben sich die relativen Häufigkeiten wie in der Abb. 2 dargestellt: 11,3 % für das Symptom "Müdigkeit", 5,5 % für das Symptom "Kopfschmerzen", 1,7 % für das Symptom "Schwindel", 1,0 % für das Symptom "gastrointestinale Symptome" und 0,7 % für das Symptom "Temperaturerhöhung". Faßt man die allgemeinen Symptome zusammen, so traten nach 44 Impfstoffverabreichungen (15,1 %) "mäßige" oder "schwere" Allgemeinreaktionen auf. Bleibt der Parameter "Müdigkeit" bei der Auswertung allgemeiner Impfreaktionen unberücksichtigt, ergibt sich eine Häufigkeit "mäßiger" oder "schwerer" Allgemeinreaktionen von 7,9 % (23/292).

Unter "Allgemeine Symptome" hatten die Probanden in der Rubrik "andere Symptome" Gelegenheit, darüber hinaus beobachtete Reaktionen zu vermerken. Insgesamt 17mal wurden Angaben bezüglich anderer Nebenwirkungen gemacht. Die genannten Symptome sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Von den Probanden berichtete sonstige Reaktionen nach Impfung mit PCEC-Vakzine

Anzahl	Symptom	Grad ⁺
8	Lymphknotenschwellung	1
3	Gliederschmerzen	1
3	Gliederschmerzen	2
1	Gliederschmerzen	3
1	Nackenschmerzen, kalte Füße	2
1	Schlaflosigkeit	2

⁺ Grade 1 bis 3 möglich

Lokalreaktionen

165mal wurden lokale Reaktionen auf die Impfung mit PCEC-Vakzine genannt (56,5 %). Im einzelnen traten auf: Schmerzen (55,1 %), Verhärtung (12,0 %), Rötung (9,2 %) und Schwellung (6,2 %). Läßt man wieder "milde" Reaktionen bzw. lokale Veränderungen mit einer Ausdehnung von bis zu 1,2 cm im Durchmesser außer Betracht, so wurden "Schmerzen" nach 15,4 % der Impfungen genannt, "Verhärtung" nach 2,4 %, "Schwellung" nach 1,7 % und "Rötung" nach 0,7 % der Impfungen (siehe Abb. 2). Zusammengefaßt traten mindestens "mäßige" lokale Impfreaktionen nach 48 PCECV-Verabreichungen (16,4 %) auf.

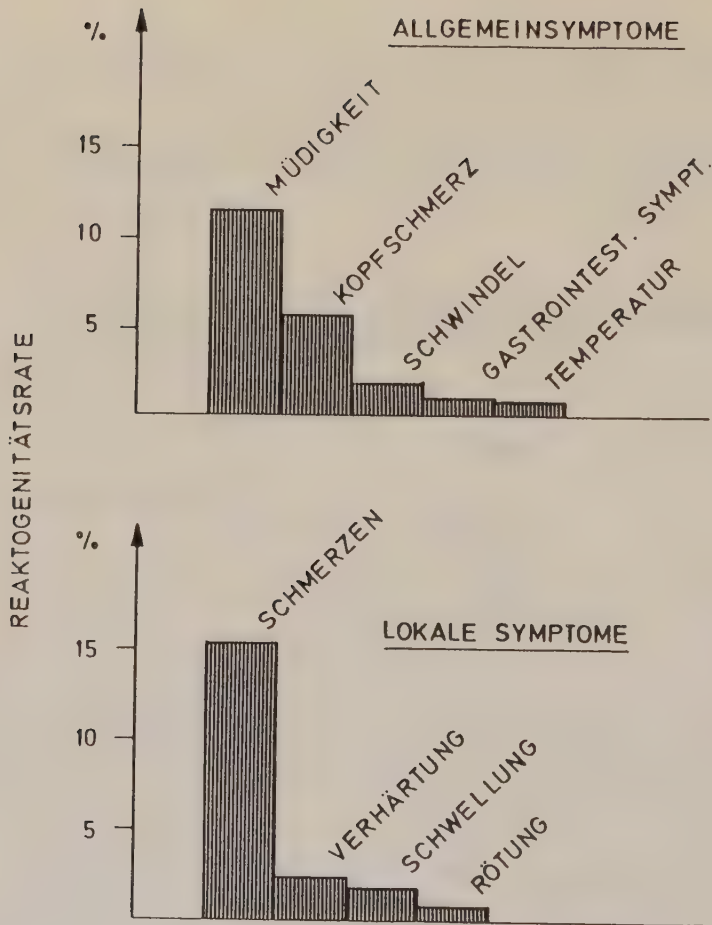


Abb. 2: Relative Häufigkeit allgemeiner und lokaler Reaktionen nach i.m.-Verabreichung von PCEC-Vakzine. Die Reaktionen wurden mittels Fragebögen erfaßt, die von den Probanden über 3 Tage aufgrund von Selbstbeobachtung geführt wurden. Nur subjektiv mindestens als 'mäßig' eingestufte Symptome wurden berücksichtigt (n = 292 Beobachtungen).

1.2 Nachweis von Serum-IgE-Antikörpern gegen Hühnereiweiß

Bei 84 der 88 Probanden (95,5 %) ergab die Bestimmung der IgE-Antikörper gegen Hühnereiweiß sowohl prävakzinal als auch nach der Verabreichung von 3 oder 4 PCEC-Impfstoffdosen einen RAST-Klassenwert von 0.

Tabelle 7: Ergebnisse der Bestimmung von Serum-IgE gegen Hühnereiweiß bei vier Probanden, RAST-Klassenwerte vor und nach drei PCEC-Impfungen

Impfstatus Proband	Prä- vakzinal	Post- vakzinal
1	0	0,13
2	0,02	0
3	0,03	0,07
4	0,30	0,35

Die von 0 abweichenden RAST-Klassenwerte sind in Tabelle 7 aufgeführt. Der Proband mit dem höchsten RAST-Klassenwert postvakzinal wies auch schon vor der ersten Impfung mit 0,30 den höchsten vom Rechner ermittelten Wert auf. Auch dieser Wert lag aber deutlich unter der kritischen Grenze von 1,0. Werte der IgE-Klassen 1, 2, 3 oder 4 wurden nicht beobachtet, so daß festgestellt werden kann, daß alle Probanden weder vor noch nach PCECV-Impfung meßbare hühnereiweißspezifische IgE-Serumspiegel hatten.

2. Immunogenität der PCEC-Tollwutvakzine

Bei allen 88 Impflingen konnten vor der ersten PCEC-Verabreichung (Tag 0) keine Serumantikörper gegen das TWV nachgewiesen werden. Im Laufe der Impfbehandlung traten bei allen Probanden sowohl komplementbindende als auch virusneutralisierende Serumantikörper auf. Die Serokonversionsrate betrug also 100 %.

2.1 Kinetik der Antikörperbildung

Abbildung 3 gibt Auskunft über den relativen Anteil Ak-positiver Probanden in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur ersten Impfung und vom angewandten Ak-Bestimmungsverfahren. Die Darstellung gilt für alle Studienteilnehmer ohne Berücksichtigung der unterschiedlich angewandten Impfschemata. Aus der Abbildung geht hervor, daß bereits 7 Tage nach der ersten PCEC-Impfung bei 74 von 88 Probanden (84 %) unter Verwendung des RFFIT neutralisierende Antikörper im Serum nachgewiesen wurden, von Tag 14 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 180) enthielten alle Seren im RFFIT neutralisierende Anti-Tollwut-Akk.

Komplementbindende Antikörper traten 14 Tage nach der ersten PCEC-Impfung erstmals auf, und zwar in 68 von 83 untersuchten Seren (82 %). Dreißig Tage nach Erstimpfung war noch ein männlicher Proband nach dreimaliger PCEC-Verabreichung ohne komplementbindende Akk. Dieselbe Person entwickelte bis zum Tag 90 einen KBR-Titer von 1 : 16 und wies diesen Wert auch ein halbes Jahr nach Impfbeginn auf.

Am Tag 90 konnten im Serum eines weiteren männlichen Probanden keine komplementbindenden Antikörper mehr nachge-

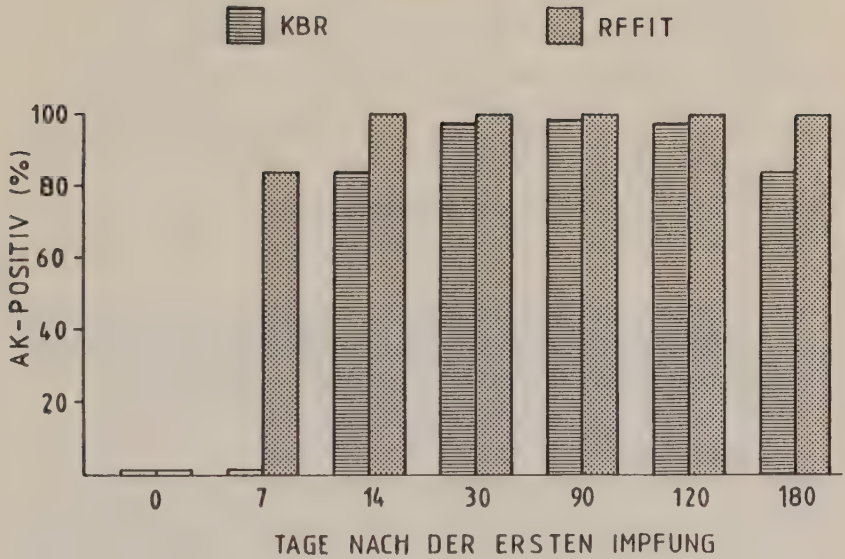


Abb. 3: Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 88 Impflingen. Tollwutantikörper wurden mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) und Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) bestimmt.

wiesen werden, nachdem derselbe dreimal an den Tagen 0,7 und 21 vakziniert worden war und an den Tagen 14 und 21 nach Erstimpfung KBR-Ak-Titer von 1:8 bzw. 1:32 aufwies. Serumproben vom Tag 120 oder 180 standen nicht zur Verfügung. Am Tag 120 wurden in einer von 56 Serumproben keine Akk in der KBR gefunden; der entsprechende Impfling hatte 5 Dosen PCEC-Impfstoff erhalten, davon 3 Dosen am Tag 0 (Gruppe V). An den Tagen 21 und 90 lag der KBR-Ak-Titer bei 1:32. Sein RFFIT-Wert am Tag 120 war 1,04 IU/ml.

Ein halbes Jahr nach Impfbeginn enthielten noch 84 % aller Probandenserum (36 von 43) komplementbindende Antikörper.

2.2 Antikörperbildung unter Berücksichtigung verschiedener Impfschemata

In Gruppe I wurden 15 Probanden (5 Frauen und 10 Männer) nach dem Essener postexpositionellen Impfschema an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90, also insgesamt sechsmal, vakziniert. Die Kinetik der Antikörperbildung bis zum Tag 180 ist für diese Gruppe in den Tabellen 22 und 23 (siehe tabellarischer Anhang S. 109) und in den Abbildungen 4 und 5 wiedergegeben. Das geometrische KBR-Titermittel stieg zunächst bis Tag 30 an und erreichte zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 1:87. Nach Boosterimpfung am Tag 90 stieg der mittlere KBR-Titer auf 1:94 am Tag 120 an, der höchste Wert während des Beobachtungszeitraumes in dieser Gruppe. Ein halbes Jahr nach Beginn des Impfschemas wies einer von acht untersuchten Proben keine komplementbindenden Serum-Akk mehr auf, die übrigen hatten KBR-Titer zwischen 1:8 und 1:64 (GMT: 11,3).

Schon 7 Tage nach Erstimpfung, also nach 2 PCECV-Verabreichungen an den Tagen 0 und 3, wiesen 13 der 15 Gruppen-

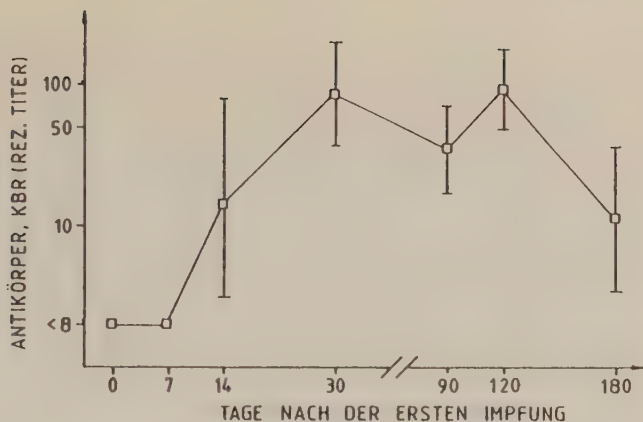


Abb. 4: Mittlere komplementbindende Tollwutantikörpertiter (GMT, reziproke Werte) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 15 Probanden (Gruppe I). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90.

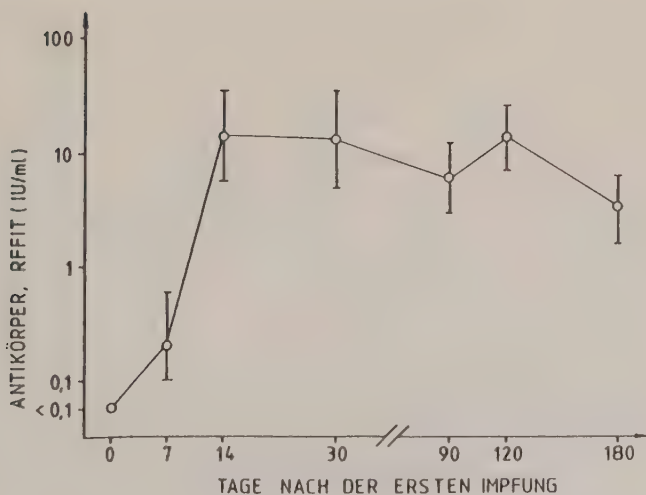


Abb. 5: Mittlere neutralisierende Tollwutantikörperwerte (GMT, IU/ml) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 15 Probanden (Gruppe I). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90.

mitglieder im RFFIT TW-Antikörper auf, die Titer lagen zwischen 0,1 IU/ml und 1,5 IU/ml. Am Tag 14 hatten alle 15 Probanden neutralisierende Serumantikörper, das GMT betrug 13,8 IU/ml mit einer Variationsbreite von 2,8 IU/ml bis 58 IU/ml. Der mittlere geometrische Ak-Titer fiel bis Tag 90 auf 6,0 IU/ml ab und wurde durch einmalige Boosterung am Tag 90 auf einen Wert von 13,9 IU/ml 30 Tage später angehoben. Sechs Monate nach Impfbeginn waren noch alle acht untersuchten Seren im RFFIT Ak-positiv, die Ak-Gehalte lagen zwischen 1,4 IU/ml und 12,8 IU/ml.

Vier Frauen und 15 Männer wurden in der Gruppe II fünfmal an den Tagen 0, 7, 14, 30 und 90 mit PCEC-Impfstoff vakziniert. Die Höhe der erreichten Antikörpertiter sind in den Tabellen 24 und 25 und in den Abbildungen 6 und 7 angegeben.

Mittels KBR konnten am Tag 14 in 9 von 18 Probandenseren (50 %) Akk nachgewiesen werden. Die entsprechenden Angaben für den Tag 30 und 90 lauten 94,4 % (17 von 18) und 100 % (17 von 17). Der am Tag 30 noch k.b.-Ak-negative Proband zeigte zwei Monate später nach insgesamt 4 Dosen PCECV einen KBR-Titer von 1:16. Komplementbindende Antikörper waren auch sechs Monate nach Erstimpfung noch in allen untersuchten Probandenseren mit einem geometrischen Titermittel von 1:27,4 vorhanden.

Im RFFIT enthielten 7 Tage nach einmaliger PCEC-Impfung 15 von 19 Probandenseren (78,9 %) neutralisierende Tollwutantikörper. Das GMT stieg bis Tag 30 (nach 3 PCEC-Dosen) auf 15,0 IU/ml an und wurde durch Boosterimpfung am Tag 90 noch einmal auf 13,1 IU/ml angehoben. Am Ende des Beobachtungszeitraumes hatten die Probanden aus Gruppe II noch RFFIT-Titer zwischen 2,1 IU/ml und 12,8 IU/ml.

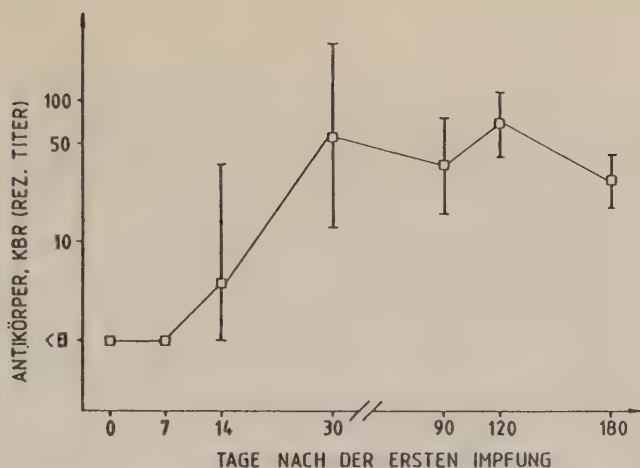


Abb. 6: Mittlere komplementbindende Tollwutantikörpertiter (GMT, reziproke Werte) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 19 Probanden (Gruppe II). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 7, 14, 30 und 90.

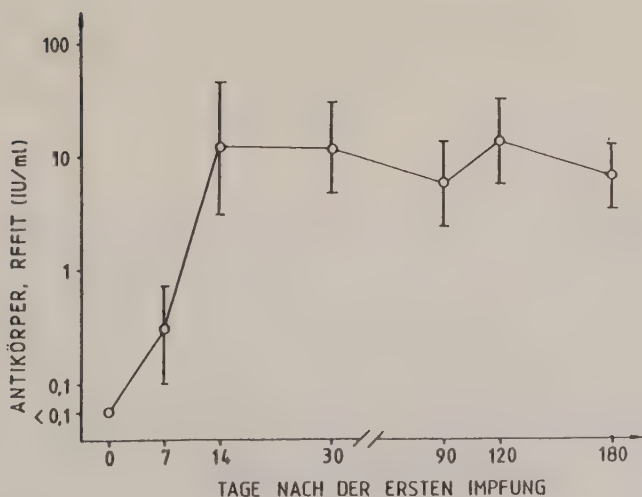


Abb. 7: Mittlere neutralisierende Tollwutantikörperwerte (GMT, IU/ml) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 19 Probanden (Gruppe II). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 7, 14, 30 und 90.

Die 14 Probanden in Gruppe III (8 Frauen, 6 Männer) wurden wie die Probanden in der Gruppe I geimpft, unter Auslassung der Boosterimpfung am Tag 90. Die Serokonversionsrate basierend auf KBR-Antikörpern stieg von 0 am Tag 7 nach Erstimpfung in einem Schritt auf 100 % am Tag 14, die KBR-Serokonversionsrate blieb bei 100 % bis vier Monate nach Erstimpfung, und 60 Tage später (Tag 180) waren noch in 5 von 7 Probandenserien (71,4 %) kb. Antikörper nachweisbar. Das höchste geometrische KBR-Titermittel wurde am Tag 30 beobachtet und betrug 1:110,4 (siehe Abb. 8). Das GMT sank dann bis Tag 180 kontinuierlich auf 1:8,8 (Variationsbreite: < 8 - 64).

Neutralisierende Antikörper (RFFIT) wurden 7 Tage nach Erstimpfung in 13 der 14 Probandenserien nachgewiesen (92,9 %). Sieben Tage später, also nach 3 Dosen PCEC-Vakzine, wiesen alle Probanden neutralisierende Akk auf, das GMT betrug 30,0 IU/ml, es sank bis Tag 180 auf 2,0 IU/ml. Aber auch am Tag 180 enthielten noch alle Serien (im RFFIT bestimmte) neutralisierende Antikörper, der niedrigste Einzelwert betrug 0,5 IU/ml. Die vollständigen Daten für Gruppe III sind in den Tabellen 26 und 27 aufgeführt.

Gruppe IV (13 Frauen, 6 Männer) wurde viermal an den Tagen 0, 7, 14 und 30 mit PCEC-Vakzine behandelt. Das Auftreten kb. und neutralisierender TW-Antikörper in dieser Gruppe ist in den Tabellen 28 und 29 und in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Eine Serokonversionsrate von 100 % wurde am Tag 14 - gemessen im RFFIT - bzw. am Tag 30 - gemessen in der KBR - erreicht. Eins von zehn Serien vom Tag 180 wies in der KBR keine TW-Akk mehr auf, während alle anderen Probanden bis zum Ende der Beobachtungszeit sowohl komplementbindende Akk als auch neutrali-

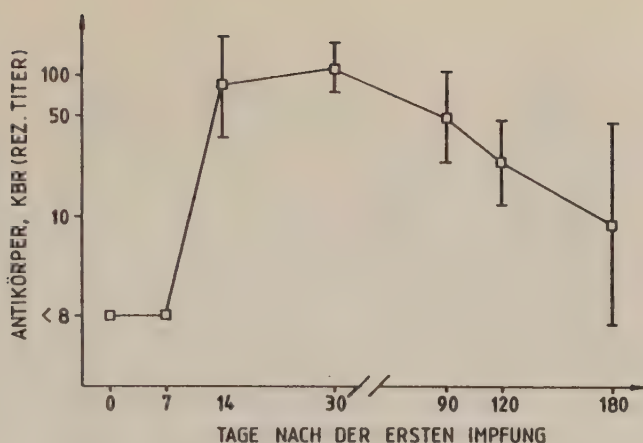


Abb. 8: Mittlere komplementbindende Tollwutantikörpertiter (GMT, reziproke Werte) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 14 Probanden (Gruppe III). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 3, 7, 14 und 30.

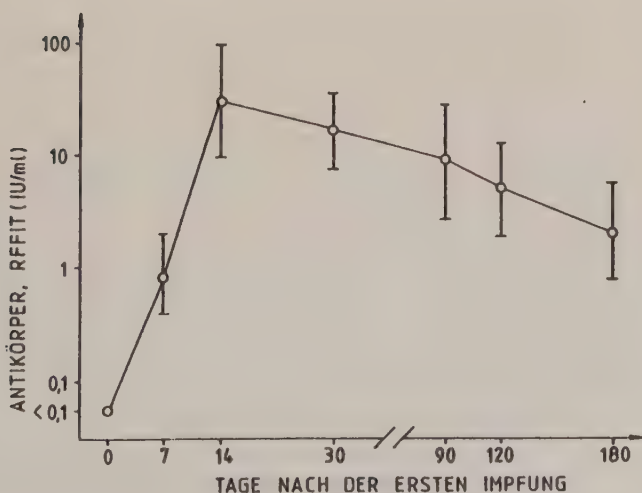


Abb. 9: Mittlere neutralisierende Tollwutantikörperwerte (GMT, IU/ml) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 14 Probanden (Gruppe III). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 3, 7, 14 und 30.

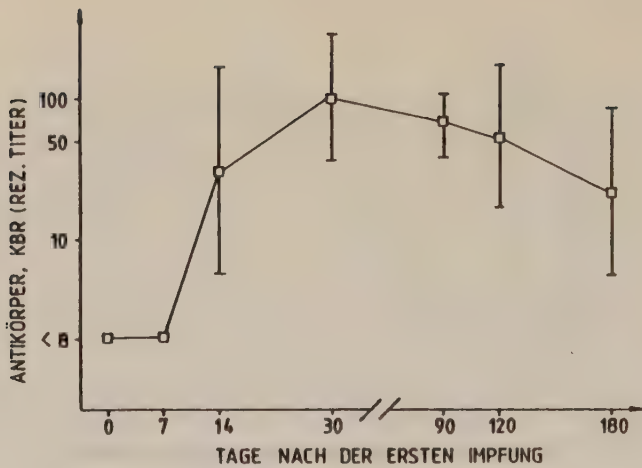


Abb. 10: Mittlere komplementbindende Tollwutantikörpertiter (GMT, reziproke Werte) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 19 Probanden (Gruppe IV). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 7, 14 und 30.

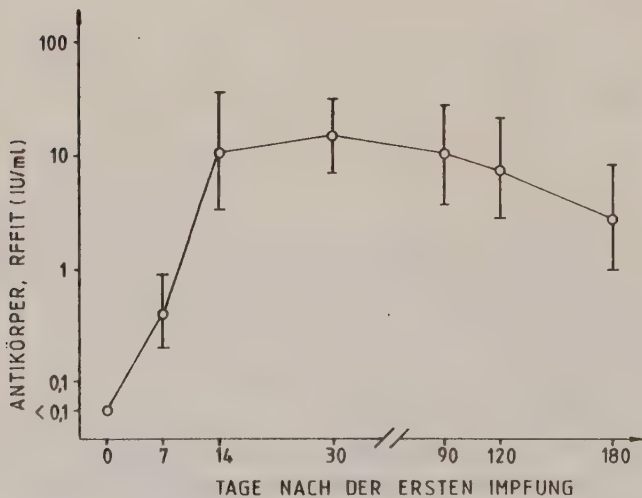


Abb. 11: Mittlere neutralisierende Tollwutantikörperwerte (GMT, IU/ml) und Standardabweichung vor und 7, 14, 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 19 Probanden (Gruppe IV). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0, 7, 14 und 30.

sierende Tollwutantikörper besaßen. In beiden Testverfahren trat das höchste geometrische Titermittel am Tag 30 auf, 15,2 IU/ml im RFFIT und 1:100,3 in der KBR. Der höchste RFFIT-Einzelwert wurde jedoch am Tag 90 mit 104 IU/ml beobachtet; derselbe Proband hatte auch 30 Tage später den höchsten Einzelwert in dieser Gruppe mit 71,9 IU/ml (120 Tage nach der ersten Impfung). Ein halbes Jahr nach Impfbeginn lagen die KBR-Titer zwischen < 8 und 128, die entsprechenden Werte für den RFFIT lauten 0,5 IU/ml und 12,8 IU/ml.

Die Gruppe V umfaßte 10 Impflinge (5 Frauen, 5 Männer), die an den Tagen 0, 7 und 21 vakziniert wurden. Dabei wurden am Tag 0 3 ml PCEC-Vakzine, verteilt auf beide Mm. deltoidei, verabreicht, an den Tagen 7 und 21 jeweils nur 1 ml.

Daraufhin traten in den Seren aller Probanden am Tag 7 neutralisierende TW-Antikörper (0,1 IU/ml - 1,5 IU/ml, GMT: 0,6 IU/ml) und am Tag 14 bei allen Probanden komplementbindende Akk (1:32 - 1:256, GMT: 1:108,4) auf. Das höchste geometrische Mittel komplementbindender Akk wurde am Tag 21 nach Impfbeginn beobachtet, es betrug 1:128. Vier Monate nach Impfbeginn wies eine Serumprobe keine kb. Akk mehr auf, der entsprechende Proband hatte am Tag 90 kb. Akk mit einem Titer von 1:32 und stand am Tag 180 nicht zur Blutentnahme zur Verfügung. Sein RFFIT-Wert am Tag 120 betrug 1,0 IU/ml. Sechs Monate nach der ersten Impfung lagen die KBR-Titer bei drei untersuchten Seren aus dieser Gruppe zwischen 1:16 und 1:64.

Das höchste geometrische Titermittel neutralisierender TW-Antikörper trat in dieser Gruppe am Tag 14 auf: 21,5 IU/ml. Es sank bis zum Ende des Beobachtungszeit-

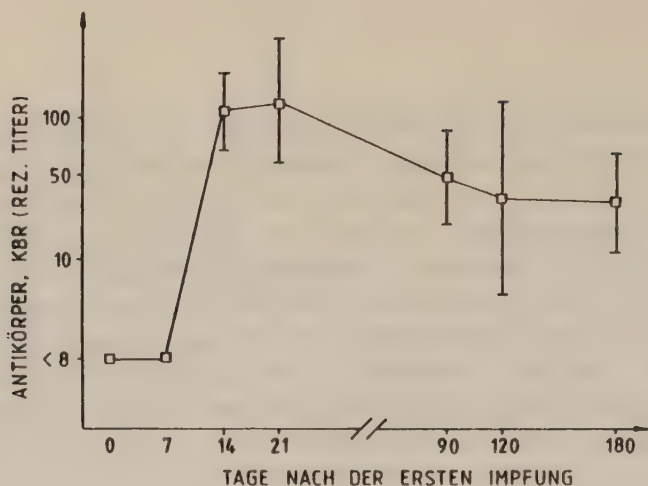


Abb. 12: Mittlere komplementbindende Tollwutantikörpertiter (GMT, reziproke Werte) und Standardabweichung vor und 7, 14, 21, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 10 Probanden (Gruppe V). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0 (3 ml), 7 (1 ml) und 21 (1 ml).

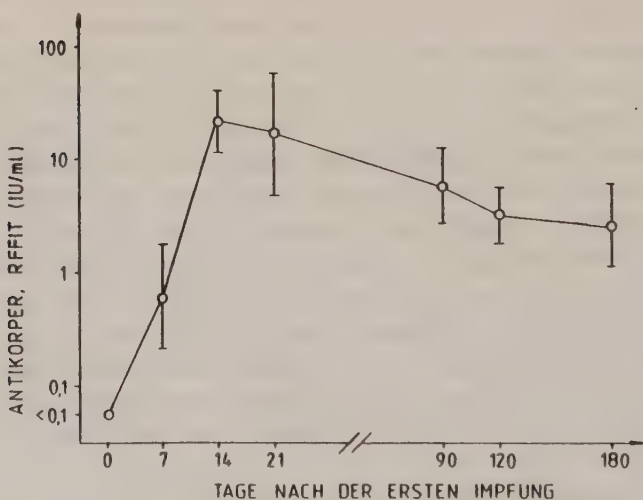


Abb. 13: Mittlere neutralisierende Tollwutantikörperwerte (GMT, IU/ml) und Standardabweichung vor und 7, 14, 21, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 10 Probanden (Gruppe V). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0 (3 ml), 7 (1 ml) und 21 (1 ml).

raums auf 2,5 IU/ml (Variationsbreite 1,1 IU/ml - 5,7 IU/ml). Die serologischen Ergebnisse sind für diese Gruppe in den Tabellen 30 und 31 und in den Abbildungen 12 und 13 wiedergegeben.

In Gruppe VI wurden fünf Frauen und sechs Männer nach dem prä-expositionellen Schema 0, 7, 21 mit PCECV (je-weils aber nur 1 ml) geimpft. Die bei diesen 11 Probanden aufgetretenen Akk-Werte sind in den Tabellen 32 und 33 und den Abbildungen 14 und 15 aufgeführt.

In der KBR wurden Akk gegen das Tollwutvirus erstmals am Tag 14 nach der ersten Impfung nachgewiesen. Alle Probanden hatten dann am Tag 21 kb. Antikörper. Neunzig Tage nach Impfbeginn lag der kb. Ak-Titer in einem von zehn Probandenseren unter 1:8, von diesem Probanden lagen keine weiteren Serumproben vor. Das höchste geometrische KBR-Titermittel trat am Tag 21 auf und betrug 1:22. Sechs Monate nach der ersten Impfung hatten noch drei von sechs Gruppenmitgliedern kb. Serumantikörper mit Titerwerten von 1:8 oder 1:16.

Die ersten neutralisierenden TW-Akk wurden in dieser Gruppe am Tag 7 post vaccinationem bei sieben der elf Impflinge beobachtet. Sieben Tage später, also nach zwei PCECV-Dosen zeigten alle Probandenseren im RFFIT neutralisierende TW-Antikörper mit Werten zwischen 0,8 IU/ml und 57,1 IU/ml. Das höchste neutralisierende GMT wurde drei Wochen nach Impfbeginn ermittelt und betrug 6,5 IU/ml; es sank bis zum Tag 180 auf 0,8 IU/ml. Die acht Einzelwerte am Ende des Beobachtungszeitraumes lagen zwischen 0,5 IU/ml und 2,6 IU/ml.

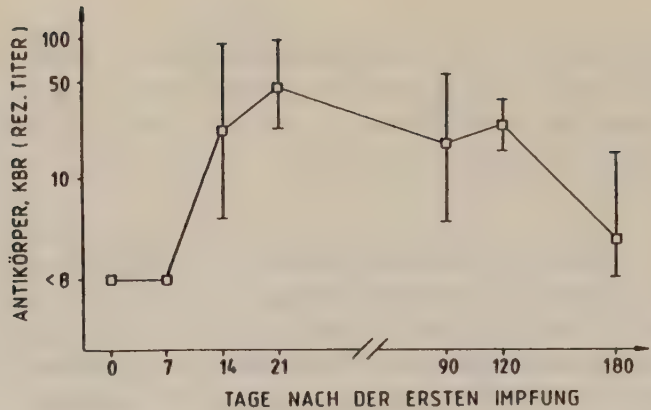


Abb. 14: Mittlere komplementbindende Tollwutantikörpertiter (GMT, reziproke Werte) und Standardabweichung vor und 7, 14, 21, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 11 Probanden (Gruppe VI). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0 (1 ml), 7 (1 ml) und 21 (1 ml).

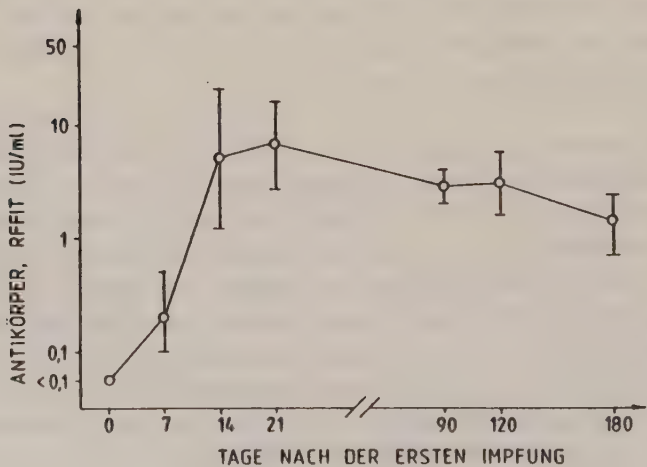


Abb. 15: Mittlere neutralisierende Tollwutantikörperwerte (GMT, IU/ml) und Standardabweichung vor und 7, 14, 21, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung mit PCEC-Vakzine bei 11 Probanden (Gruppe VI). Die Impfungen erfolgten an den Tagen 0 (1 ml), 7 (1 ml) und 21 (1 ml).

2.3 Bedeutung der Impfung am Tag 3

Die Probanden in den Gruppen I und III wurden während der ersten Woche der Impfsreihe dreimal vakziniert (an den Tagen 0, 3 und 7), während die Probanden in den Gruppen II, IV und VI in diesem Zeitraum nur zwei Dosen PCECV, und zwar an den Tagen 0 und 7 erhielten. In Tabelle 8 sind vergleichend für diese beiden Kollektive die relativen Anteile antikörper-positiver Probanden an den Tagen 7 und 14 aufgeführt. Sieben Tage nach einmaliger PCECV-Verabreichung wiesen 77,6 % der so Geimpften (38 von 49) im RFFIT bestimmte, neutralisierende Tollwutantikörper auf, der entsprechende Wert betrug für die 29 Probanden aus den Gruppen I und III, die zusätzlich am Tag 3 vakziniert worden waren, 89,7 %. Vierzehn Tage nach der ersten Impfung hatten alle Probanden aus beiden Kollektiven neutralisierende Tollwutantikörper.

Tabelle 8 : Auftreten neutralisierender Tollwutantikörper (RFFIT) an den Tagen 7 und 14 nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0 und 7 (A) bzw. an den Tagen 0, 3 und 7 (B), relativer Anteil (%) antikörper-positiver Probanden;
A: n=49, B: n=29.

Probanden- kollektiv Tage nach Erstimpfung	A Impfungen an den Tagen 0 und 7	B Impfungen an den Tagen 0,3,7	Signifikanz der Differenz (Chi-Quadrat-Test)
7	77,6 %	89,7 %	n.s.
14	100 %	100 %	—

n.s. = nicht signifikant

Vergleicht man die relativen Anteile der Probanden in beiden Kollektiven, die am Tag 7 bereits den von der WHO angegebenen, Immunität repräsentierenden Grenzwert von 0,5 IU/ml erreichten, so lautet der Wert für das Kollektiv mit Impfung am Tag 3 (Gruppe B) 51,7 % (15 von 29). Dagegen hatten nur 38,8 % (19 von 49) der Probanden in Gruppe A, die nur am Tag 0, nicht aber am Tag 3 mit einer Dosis PCECV vakziniert worden waren, am Tag 7 einen Serum-Ak-Gehalt von mindestens 0,5 IU/ml.

Tabelle 9 : Relativer Anteil (%) Probanden mit einem neutralisierenden TW-Ak-Wert von mindestens 0,5 IU/ml nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0 und 7 (A) bzw. an den Tagen 0, 3 und 7 (B); A: n=49, B: n=29.

Probanden- Tage kollektiv nach Erstimpfung	A Impfungen an den Tagen 0, 7	B Impfungen an den Tagen 0, 3, 7	Signifikanz der Differenz (Chi-Quadrat-Test)
7	38,8 %	51,7 %	n.s.
14	100 %	100 %	—

n.s. = nicht signifikant

Komplementbindende Antikörper wurden am Tag 14 in 89,7 % derjenigen Seren gefunden, die von Probanden mit PCECV-Verabreichung am Tag 3 stammten (Gruppe I und III, n=29), während die 46 Probanden aus den Gruppen II, IV und VI (Impfungen an den Tagen 0 und 7) an diesem Tag nur zu 73,9 % kb. Antikörper aufwiesen. (Tabelle 10).

Tabelle 10 : Auftreten komplementbindender Tollwutantikörper (KBR) an den Tagen 7, 14 und 30 nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0, 7 und 14 (A) bzw. an den Tagen 0, 3, 7 und 14 (B); relativer Anteil (%) antikörper-positiver Probanden; A: n=49, B: n=29.

Probanden- kollektiv Tage nach Erstimp- fung	A Impfungen an den Ta- gen 0,7,14	B Impfungen an den Ta- gen 0,3,7,14	Signifikanz der Diffe- renz (Chi-Quadrat- Test)
7	0 %	0 %	—
14	73,9 %	89,7 %	n.s.
30	97,1 %	100 %	n.s.

n.s. = nicht signifikant

Alle diese Gruppenunterschiede hinsichtlich der alternativen Merkmalsausprägung Ak-positiv oder Ak-negativ wurden im Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz überprüft. Alle Unterschiede in den relativen Anteilen erreichten nicht die Signifikanzgrenze einer Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5 %. Nur für die Differenz der relativen Anteile in der KBR positiver Reagenten am Tag 14 ergab sich im Chi-Quadrat-Test für die Annahme eines signifikanten Unterschiedes eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 10 % (α kleiner 0,1).

Signifikante Unterschiede traten jedoch hinsichtlich der quantitativen Antikörpergehalte auf. In Tabelle 11 sind vergleichend für die beiden Kollektive die an den Tagen 7, 14 und 30 erreichten geometrischen Titermittel in der

Komplementbindungsreaktion aufgeführt. Die Unterschiede in den GMT wurden mittels STUDENT-t-Test auf Signifikanz überprüft.

Tabelle 11 : Geometrische KBR-Titermittel (reziproke Werte) nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0, 7, 14 (A) und nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0, 3, 7, 14 (B). In dem Kollektiv A wurden an den Tagen 7 und 14 die Gruppen II, IV und VI zusammengefaßt, am Tag 30 nur die Gruppen II und IV. In dem Kollektiv B wurden die Gruppen I und III zusammengefaßt; A: n=49, B: n=29.

Probanden- Tage nach Erstimp- fung kollektiv	A Impfungen an den Ta- gen 0,7,14	B Impfungen an den Ta- gen 0,3,7,14	F	t - Test Irrtums- wahrschein- lichkeit alpha
7	<8	< 8	1,00	—
14	13,9	33,6	2,42	<0,05
30	73,6	98,4	1,34	n.s.

n.s. = nicht signifikant

F = Unterschied (Faktor)

Am Tag 7 nach Impfbeginn waren in beiden Kollektiven noch keine komplementbindenden Tollwut-Antikörper nachzuweisen. Sieben Tage später betrug das geometrische KBR-Titermittel für die Probanden mit Impfung am Tag 3 1:34, dieser Wert lag um den Faktor 2,42 über dem entsprechenden Datum für das Kollektiv A, das am Tag 3 nicht zusätzlich geimpft worden war. Der vier Wochen nach Impfbeginn beobachtete Unter-

schied zwischen den mittleren KBR-Titern erreichte nicht mehr die Signifikanzgrenze von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit.

Den entsprechenden Vergleich auf der Basis der im RFFIT ermittelten Serum-Ak-Gehalte zeigt die Tabelle 12.

Tabelle 12: Geometrische RFFIT-Titermittel (IU/ml) nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0, 7, 14 (A) und nach PCECV-Impfungen an den Tagen 0, 3, 7, 14 (B). In dem Kollektiv A wurden an den Tagen 7 und 14 die Gruppen II, IV und VI zusammengefaßt, am Tag 30 nur die Gruppen II und IV. In dem Kollektiv B wurden die Gruppen I und III zusammengefaßt; A: n=49, B: n=29.

Probanden- kollektiv Tage nach Erstimp- fung	A Impfungen an den Ta- gen 0,7,14	B Impfungen an den Ta- gen 0,3,7,14	F	t - Test Irrtums- wahrschein- lichkeit alpha
7	0,3	0,4	1,33	< 0,05
14	9,3	20,1	2,16	< 0,05
30	13,3	14,9	1,12	n.s.

n.s. = nicht signifikant

F = Unterschied (Faktor)

In den Serumgehalten neutralisierender TW-Antikörper traten an den Tagen 7 und 14 nach der ersten Impfung statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Probanden auf, je nachdem ob sie am Tag 3 geimpft worden waren oder nicht. Am Tag 14 betrug das geometrische RFFIT-Titermittel für

das Kollektiv B (Impfungen an den Tagen 0, 3 und 7) 20,1 IU/ml, das ist das 2,16fache des Wertes der Vergleichsgruppe A.

2.4 Bedeutung der Impfung am Tag 90

Die Gruppen I und II unterschieden sich von allen anderen studienteilnehmenden Gruppen durch die Boosterimpfung am Tag 90. Vergleicht man die geometrischen KBR- und RFFIT-Titermittel aller Probanden aus den Gruppen I und II mit den Mittelwerten aller übrigen Probanden, so läßt sich deutlich die titersteigernde Wirkung der Boosterinjektion ablesen (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13: Geometrische RFFIT-Titermittel (IU/ml) bei Probanden, die auch am Tag 90 mit PCECV vakziniert wurden (A), und Probanden ohne diese Boosterimpfung (B). In dem Kollektiv A wurden die Gruppen I und II, in dem Kollektiv B die Gruppen III - VI zusammengefaßt;
A: n = 30, B: n = 43.

Tage nach Erstimpfung \ Probandenkollektiv	A geboostert	B nicht geboostert	F	Signifikanzniveau
90	5,8	6,6	0,88	n.s.
120	13,5	4,8	2,81	<0,001
180	4,8	1,8	2,67	< 0,01

n.s. = nicht signifikant

F = Unterschied (Faktor)

Die dreißig am Tag 90 geboosterten Probanden wiesen dreißig Tage später ein geometrisches Titermittel neutralisierender TW-Antikörper von 13,5 IU/ml auf, der entsprechende Wert für die nicht revakzinierte Kontrolle lautete:

4,8 IU/ml. In der geboosterten Gruppe lagen die neutralisierenden Antikörperwerte also um den Faktor 2,81 über denen der Kontrollgruppe. Auch am Ende des Beobachtungszeitraumes von 180 Tagen bestand noch eine hoch signifikante Titerdifferenz von 1,8 IU/ml zu 4,8 IU/ml, Faktor: 2,67.

Den entsprechenden Vergleich auf der Basis der mittels KBR gefundenen Antikörpertiter zeigt Tabelle 14. Durch PCECV-Verabreichung stieg der mittlere KBR-Titer von 1:35 am Tag 90 auf 1:81 dreißig Tage später und betrug auch ein halbes Jahr nach Impfbeginn noch 1:18. In der nicht geboosterten Kontrollgruppe fiel der mittlere KBR-Titer dagegen von 1:40 am Tag 90 auf 1:33 am Tag 120 und weiter auf 1:11 am Tag 180. Zu diesem Zeitpunkt wiesen in der nicht geboosterten Gruppe noch 76,9 % (20 von 26) der Probanden KBR-Antikörper im Serum auf, während der Anteil kb.-Ak-positiver Probanden unter den geboosterten Impfungen noch 94,1 % (16 von 17) betrug.

Tabelle 14 : Geometrische KBR-Titermittel (reziproke Werte) bei Probanden, die auch am Tag 90 mit PCECV vakziniert wurden (A), und Probanden ohne diese Boosterimpfung (B). In dem Kollektiv A wurden die Gruppen I und II, in dem Kollektiv B die Gruppen III-VI zusammengefaßt; A: n = 30, B: n = 43.

Probanden- kollektiv Tage nach Erstimp- fung	A geboostert	B nicht geboostert	F	Signifikanz- niveau
90	35,2	40,0	0,88	n.s.
120	80,9	33,3	2,43	<0,01
180	18,1	11,3	1,60	n.s. <0,3

n.s. = nicht signifikant

F = Unterschied (Faktor)

3. Interferoninduktion

Die Impflinge in den Gruppen V und VI wurden zum Zeitpunkt der Impfung (Stunde 0) sowie 7, 20, 24 und 30 Stunden nach i.m.-Applikation von 3 ml (Gruppe V) bzw. 1 ml (Gruppe VI) PCEC-Vakzine auf das Vorhandensein von Seruminterferon untersucht. Die Interferonbestimmung erfolgte in kodierten Proben in den Laboratorien der Behringwerke. Die ermittelten Seruminterferontiter sind in der Tabelle 15 für Gruppe V und in der Tabelle 16 für Gruppe VI wiedergegeben. Die Anzahl Gruppenmitglieder, die mit einer Interferoninduktion reagierten, zeigt Abbildung 16.

Nach 3 ml PCEC-Vakzine bildeten 7 von 10 Probanden Seruminterferon. Sieben Stunden nach der PCECV-Gabe zeigten drei der zehn Probanden Seruminterferontiter von 1:5 oder 1:20. Bis zur 20. Stunde nach Impfung kamen vier weitere IF-positive Impflinge hinzu und mit 7 von 10 wurde der maximale relative Anteil positiver Probanden erreicht. Die Titerwerte lagen zu diesem Zeitpunkt zwischen 1:12 und 1:50. Der höchste Titerwert wurde 24 Stunden nach PCECV-Applikation beobachtet und betrug 1:80. Am Ende des Beobachtungszeitraumes (30 Stunden nach Impfung) waren noch 4 der 10 Impflinge IF-positiv.

Nach der Gabe von 1 ml PCEC-Impfstoff entwickelten nur 2 von 11 Probanden meßbare Seruminterferongehalte. Diese konnten 20 Stunden nach Impfung erstmalig beobachtet werden. Zehn Stunden später zeigte keines dieser 11 Probandenseren antivirale Interferonaktivität mehr. Die nach 1 ml PCECV aufgetretenen IF-Titer lagen zwischen 1:10 und 1:20.

Tabelle 15 : Seruminterferontiter (reziproke Werte) 0, 7, 20, 24 und 30 Stunden nach i.m.-Applikation von 3 ml PCEC-Tollwutvakzine bei 10 Probanden.

Proband Nr.	S t u n d e n n a c h I m p f u n g				
	0 h Prävakzinal	7 h	20 h	24 h	30 h
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	20	13	10	—
4	—	—	40	80	40
5	—	—	12	20	14
6	—	5	50	40	25
7	—	—	—	—	—
8	—	5	32	7	—
9	—	—	32	28	40
10	—	—	14	—	—
IF-Positiv	0/10	3/10	7/10	6/10	4/10
% IF-Positiv	0 %	30 %	70 %	60 %	40 %

— = Interferontiter < 1:5

Tabelle 16 : Seruminterferontiter (reziproke Werte) 0, 7, 20, 24 und 30 Stunden nach i.m.-Applikation von 1 ml PCEC-Tollwutvakzine bei 11 Probanden

Proband Nr.	S t u n d e n n a c h I m p f u n g				
	0 h Prävakzinal	7 h	20 h	24 h	30 h
1	—	—	—	—	—
2	—	—	20	10	—
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	—	—	16	—	—
7	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—
IF-Positiv	0/11	0/11	2/11	1/11	0/11
§ IF-Positiv	0 %	0 %	18,2 %	9,1 %	0 %

— = Interferontiter < 1:5

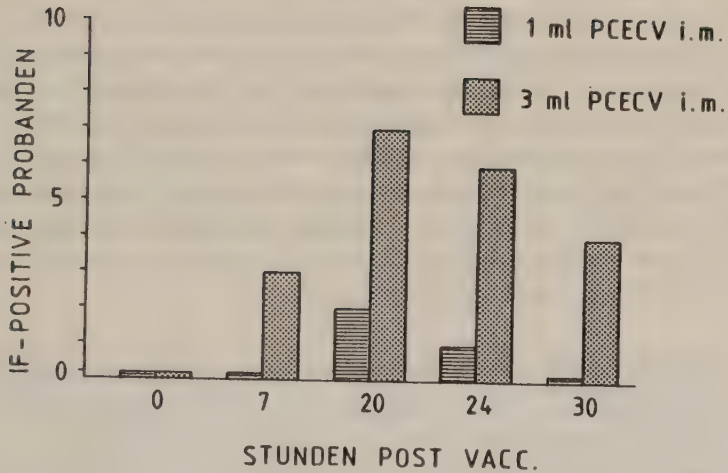


Abb. 16: Anzahl Interferon-positiver Probanden vor und 7, 20, 24 und 30 Stunden nach Erstimpfung mit 1 ml bzw. 3 ml PCEC-Vakzine. Die dreifache Dosis erhielten 10 Probanden (Gruppe V), die 1 ml-Dosis wurde an 11 Impflinge (Gruppe VI) verabreicht.

C. Diskussion

Der in der hier vorgelegten Studie geprüfte Impfstoff wird durch die folgenden Eigenschaften charakterisiert. Immunisierendes Antigen ist der von der WHO als Impfvirus empfohlene Tollwutvirusstamm Flury LEF, Varietas C 25. Als antigenproduzierendes Zellkultursystem dienen aus SPF-Eiern oder aus Eiern gesunder Herden gewonnene primäre Hühnerembryofibroblastenkulturen. Das aus den CEC-Kulturen gewonnene Impfvirus wird mit Betapropiolacton inaktiviert und durch kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und konzentriert (17).

Die derzeit etablierte HDCS-Tollwutgewebekulturvakzine besitzt neben ihrer hohen Antigenität und Schutzkraft den Vorteil, in homologen, also ursprünglich vom Menschen stammenden, Zellkultursystemen produziert zu werden. Dieser Umstand eliminiert von vornherein das Risiko schwerwiegender Nebenwirkungen im Sinne einer unerwünschten Immunantwort gegenüber heterologem Material, wie sie etwa für die Gehirngewebeimpfstoffe als Antikörperinduktion gegen ZNS-organspezifisches Antigen oder für die Enteneivakzine alten Typs als erhebliche lokale Unverträglichkeit aufgrund immunologischer Mechanismen typisch waren.

Das Kriterium der in dieser Hinsicht a priori-Unbedenklichkeit erfüllt die PCEC-Vakzine nicht. Deshalb verdient der Punkt Reaktogenität bei der klinischen Prüfung des neuen Tollwutimpfstoffes besondere Beachtung.

1. Reaktogenität

In der hier vorgelegten Studie wurden insgesamt nach 180 der 292 (61,6 %) ausgewerteten Impfinjektionen Nebenwirkungen durch die Impflinge subjektiv protokolliert. Dabei traten 91mal Allgemeinreaktionen (31,2 %) und 165mal lokale Reaktionen (56,5 %) auf. Die bisher publizierten Daten zur Reaktogenität der PCEC-Vakzine führt die Tabelle 17 auf. Alle Daten der Tabelle wurden durch ärztliche Untersuchung oder ärztliche Befragung erhoben. Es imponiert eine

Tabelle 17 : Reaktogenität der PCEC-Vakzine nach Literaturangaben

Autoren, Land der Untersuchung	n	Lokale Reaktionen (%)	Allgemeine Reaktionen (%)
1. SEHGAL Indien (125)	90	20,0	6,7
2. LJUBICIC et.al. Jugoslawien (81)	1501	5,5	0
3. WASI et.al. Thailand (143)	66	89,4	9,1

n = Anzahl Impfinjektionen

große Variationsbreite insbesondere bezüglich des relativen Anteils lokaler Nebenwirkungen (5,5 - 89,4 %), allerdings differieren auch die jeweils beobachteten Probandenzahlen und Orte der Untersuchungen erheblich.

Hinsichtlich der lokalen Nebenwirkungen liegt der in der hier vorgelegten Studie aufgeführte relative Anteil (61,6 %) im oberen Bereich der Variationsbreite entsprechen- der Literaturangaben, der Anteil protokollierter Allgemeinreaktionen (31,2 %) übersteigt den maximalen von WASI et al. (143) ermittelten Wert (9,1 %) um mehr als das Dreifache.

Die Münchener Probanden - allesamt tiermedizinische Studenten oder wissenschaftliche Assistenten - protokollierten die beobachteten Symptome subjektiv ohne ärztliche Kontrolle. Diese Methode führt auch nach den Erfahrungen bei anderen Impfstudien zu einem relativ hohen Anteil geringgradiger und nur dem subjektiven Empfinden zugänglicher Nebenwirkungen. In dieser Studie wurde z.B. nach 23 % aller Impfinjektionen über "Müdigkeit" geklagt, davon in der Hälfte der Fälle mit der Gradangabe "mild". SCHEIERMANN fand 1983 (114) bei der Überprüfung der Reaktogenitätsrate verschiedener Hepatitis B-Impfstoffe mittels Fragebogenaktion deutlich abnehmende Reaktogenitätsraten im Verlauf einer aus drei Injektionen bestehenden Impfsreihe. Offensichtlich erfolgte eine zunehmende subjektive Minderbewertung der mit der Impfung in Zusammenhang gebrachten Befindensstörungen. 1975 untersuchten KUWERT et al. (67a) die Verträglichkeit eines attenuierten Influenza-Lebendimpfstoffes an medizinisch vorgebildeten Probanden mittels Fragebogenerhebung. Sie fanden, daß die subjektiv protokollierten Symptome rauher Hals, Rachenrötung, Kopf- und Gliederschmerzen nach "Impfung" in einer mit einem Placebo-Präparat behandelten Gruppe häufiger als unter den tatsächlich Vakzinierten berichtet wurden.

Es erschien deshalb gerechtfertigt und angezeigt, in einem zweiten Schritt die als "mild" beurteilten und geringgradigen Veränderungen bei der Auswertung der Fragebögen außer Betracht zu lassen und die Reaktogenitätsrate erneut zu ermitteln.

Die dabei gefundenen Werte (16,4 % für lokale Impfreaktionen und 15,1 % für Allgemeinsymptome) lagen durchaus im Rahmen der von den drei anderen Untersuchergruppen ermittelten Befunde.

Die gute Verträglichkeit der PCEC-Vakzine wird besonders deutlich, wenn bei der Auszählung allgemeiner Impfreaktionen der Parameter "Müdigkeit" unberücksichtigt bleibt. Dann resultiert in dieser Studie an mitteleuropäischen Probanden eine Reaktogenitätsrate hinsichtlich mindestens "mäßiger" Allgemeinreaktionen von 7,9 %.

Bei keinem der 88 untersuchten Probanden konnten hühnereiweißspezifische Immunglobuline der Klasse E mittels Radio Allergo Sorbens Test im Serum nachgewiesen werden. Ihr Auftreten nach PCECV-Impfung wäre ein Hinweis auf eine durch die auf Hühnerembryofibroblasten produzierte PCEC-Vakzine induzierte Hühnereiweißallergie. Aufgrund der von BARTH et al. (16) durchgeführten Labortests und der bei der Herstellung angewandten Reinigung des Antigens mittels kontinuierlicher Dichtegradientenultrazentrifugation war eine Induktion von Serum-IgE-Antikörpern gegen hühnerspezifisches Protein eigentlich nicht zu erwarten. BARTH et al. (16) führten mit den Chargen 5, 7 und 10 der PCEC-Vakzine im Vergleich mit verschiedenen Konzentrationen eines Eialbuminstandards Agargelpräzipitationstests durch (Partigen^R -Behringwerke AG, Marburg) und fanden in keinem Fall auf Hühnereiweiß hinweisende Präzipitationsbanden. Zwei Gruppen Meerschweinchen wurde PCECV einerseits und Hühnerembryozellsuspension andererseits inokuliert und 28 Tage später homogenisierte Hühnerembryofibroblastensuspension i.v. verabreicht. Während alle zuvor mit Zellsuspension sensibilisierten Meerschweinchen schwere anaphylaktische Symptome zeigten und drei von 10 Versuchstieren starben, blieben alle mit PCECV vorbehandelten Tiere symptomfrei. PCEC-Impfstoff zeigte also für das Versuchstier keine gegenüber Hühnereiweiß sensibilisierende Aktivität.

Am Menschen wurden vor der hier vorgestellten Studie jedoch noch keine Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung vorgenommen. Die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen die tierexperimentellen Befunde, wonach keine Allergisierung gegen Hühnereiweiß durch die PCEC-Vakzine hervorgerufen wird. Im Gegensatz zu dem klinischen Versuchsansatz von BARTH et al. (16) wurden die Untersuchungen an den Münchener Probanden jedoch mit dem weitaus empfindlicheren Radio Immuno Assay durchgeführt.

2. Immunogenität

Die Ergebnisse hinsichtlich der Immunogenität des neuen Tollwutgewebekulturimpfstoffes sollen einerseits auf ihre Übereinstimmung mit den wenigen bisher publizierten Daten zur Antikörperinduktion durch diese Vakzine hin diskutiert werden. Zum anderen soll erörtert werden, inwieweit die Immunogenität der PCECV die vom Human Diploid Cell Strain-(HDCS-) Tollwutimpfstoff aufgestellten Maßstäbe einer sicheren und wirksamen Tollwutimpfung erreicht.

LJUBICIC et al. (81) vakzinierten 64 freiwillige Probanden nach dem post-expositionellen Essener Impfschema an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90 und bestimmten neutralisierende Tollwutantikörper mit dem Mäuseneutralisationstest (MNT). Die von ihnen erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt. Vierzehn Tage nach der ersten Impfung betrug die Serokonversionsrate 84 %, am Tag 30 enthielten alle 64 Probandenserum mehr als 0,5 IU/ml neutralisierende Tollwutantikörper. Vergleicht man die von LJUBICIC et al. ermittelten AK-Titer mit den in dieser Studie für die Gruppen I und III erzielten Ergebnisse, so ergeben sich folgende Unterschiede: Eine Serokonversionsrate von 100 % trat bei den Münchener Probanden bereits am Tag 14 auf, während diese in der jugoslawischen Studie erst am Tag 30 erreicht wurde. Maximale mittlere Titer

wurden hier bereits zwei Wochen nach Erstimpfung beobachtet, während dort die höchsten Werte erst zwei Wochen später (Tag 30) auftraten. Insbesondere im Verlauf des ersten Monats der Impfbehandlung wurden in der Essener Studie höhere neutralisierende Ak-Werte gefunden, der mittlere Titer lag z.B. am Tag 14 um den Faktor 15 über dem Wert der jugoslawischen Probanden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß LJUBICIC et al. die PCECV-Charge 010 einsetzten, die einen Antigenwert (Antigenic Value) von 2,7 IU/Dosis aufwies, während die PCECV-Charge der Essener Studie einen Ag-Wert von 8,7 IU/Dosis hatte.

WASI et al. (143) führten 28 PCECV-Impfungen nach demselben sechsfachen post-expositionellen Schema mit der Charge 014 (Ag-Wert: 7,5 IU/Dosis) durch. WASI et al. bestimmten neutralisierende TW-Antikörper mit dem Mäuseneutralisationstest und fanden eine 100%ige Serokonversionsrate wie auch in der Essener Studie bereits am Tag 14 nach Erstimpfung. Der am Tag 30 von WASI et al. im Versuchstier ermittelte mittlere N-Titer von 12,2 IU/ml erreichte fast die entsprechenden bei den Münchener Probanden in den Gruppen I und III am Tag 30 beobachteten Werte: 13,5 IU/ml und 16,5 IU/ml.

Tabelle 18 : Tollwut-Antikörperwerte (MNT, IU/ml) nach simulierter post-expositioneller Applikation von PCEC-Vakzine * bei 64 freiwilligen Probanden, nach LJUBICIC et al., 1984 (81).

	Tage nach der ersten Impfung					
	0	7	14	30	90	120
GMT (IU/ml)	0	0,11	1,31	4,53	4,33	14,09
VB	0	0,1-0,7	0,1-13,4	0,8-24,5	1,6-42,5	2,3-150,0

GMT = geometrisches Titermittel, VB = Variationsbreite

* Charge 010, Antigenwert: 2,7 IU/Dosis

Tabelle 19 : Neutralisierende Tollwutantikörper (MNT, IU/ml) nach simulierter post-expositioneller PCECV-Impfung an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90, nach WASI et al., 1984 (143).

	Tage nach der ersten Impfung					
	0	7	14	30	90	100
GMT (IU/ml)	<0,02	<0,02	8,0	12,2	3,7	28,8
VB	—	—	0,8-69,3	3,8-69,3	0,8-21,8	2,7-87,3

PCEC-Impfstoff, Charge 14, Antigenwert: 7,5 IU/Dosis
n = 28

GMT = geometrisches Titermittel, VB= Variationsbreite

Die vollständigen Daten sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Dieselben Autoren führten auch 22 Tollwutimpfungen nach dem prä-expositionellen Impfschema 0, 7, 21 durch und kontrollierten das Auftreten neutralisierender Serumantikörper wiederum mittels MNT (siehe Tabelle 20). Eine Serokonversionsrate von 100 % wurde wie auch bei der prä-expositionellen Gruppe VI der Essener Studie 14 Tage nach der ersten Impfung erreicht. Nahezu übereinstimmende mittlere Ak-Titer traten in beiden prä-expositionell vakzinierten Kollektiven am Tag der dritten Injektion (21) auf: 6,3 IU/ml bei den von WASI et al. in Bangkok Geimpften (VB: 1,4 - 21,8 IU/ml) bzw. 6,5 IU/ml (VB: 1,9 - 31,4 IU/ml) bei der Essener Gruppe VI.

Tabelle 20 : Neutralisierende Tollwutantikörper (MNT, IU/ml) nach prä-expositioneller Applikation von PCEC-Vakzine* an den Tagen 0, 7 und 21, n = 22, nach WASI et al., 1984 (143).

	Tage nach der ersten Impfung					
	0	7	14	21	30	100
GMT (IU/ml)	< 0,02	< 0,02	6,9	6,3	20,6	3,2
VB	—	—	2,2-11,3	1,4-21,8	3,8-87,3	0,9-8,7

GMT = geometrisches Titermittel, VB = Variationsbreite

*Charge 014, Antigenwert: 7,5 IU/Dosis.

Die hier verglichenen neutralisierenden Tollwutantikörpertiter differieren hinsichtlich der Bestimmungsmethode: Mäuseneutralisationstest für die aus der Literatur zitierten Ak-Werte und Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test für die in dieser Studie erzielten Ergebnisse. SMITH et al. (129) haben 1973 bei der Beschreibung des RFFIT gezeigt, daß die von ihnen im RFFIT gemessenen, neutralisierenden TW-Antikörpertiter eng mit in denselben Proben gemessenen Mäuseneutralisationstitern korrelierten. So waren 487 von 512 Tollwutimmunseren in beiden Testsystemen gleichermaßen Ak-positiv. LOUIE et al. (82) verglichen 1975 ebenfalls MNT und RFFIT zur Bestimmung neutralisierender Tollwutantikörper. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, daß MNT und RFFIT gleichwertig seien. ZALAN et al. untersuchten 1979 die Vergleichbarkeit der bei dieser Studie eingesetzten Variante des RFFIT in Mikrotiterplatten mit der Standardmethode MNT (155), und auch von diesen Untersuchern wurde eine enge Übereinstimmung der Ergebnisse beider Neutralisationsteste bestätigt.

HAASE et al. (35) berichteten zwar 1985, daß bei der Bestimmung des Antikörpergehaltes humaner Immunglobulinpräparate durch Vergleich mit einem equinen Antitollwut-Standardserum im MNT zwei- bis zehnfach höhere AK-Titer ermittelt wurden als mittels RFFIT. Da bei den oben angestellten Vergleichen aber die in der Essener Studie mittels RFFIT gefundenen Ak-Werte tendenziell eher höher lagen als die aus der Literatur zitierten mittels MNT ermittelten Ak-Gehalte, stehen die Befunde von HAASE et al. nicht der Aussage entgegen, daß in der Essener Studie die PCEC-Vakzine eine mindestens ebenso große Fähigkeit zur Antikörperinduktion bewies wie in den im Ausland durchgeführten vorausgegangenen Untersuchungen.

Bisher lagen keine Erfahrungen über die Tollwut-Ak-Bestimmung nach PCECV-Impfung mit der Komplementbindungsreaktion vor. KUWERT et al. haben 1976 für mit HDCS-Vakzine geimpfte Probanden die Korrelation kb. Antikörper mit neutralisierenden TW-Akk aufgezeigt (68). In der hier vorgestellten Studie wurden keine quantitativen Korrelationen zwischen in der KBR und im RFFIT bestimmten Antikörpern ermittelt. Für eine qualitative Korrelation sprach bei diesen Untersuchungen, daß in beiden Testsystemen für alle Impflinge Tollwutantikörper nachweisbar waren und daß die Effekte der zusätzlichen PCECV-Gaben am Tag 3 und 90 in beiden Testsystemen nachweisbar waren.

Für den Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit kb. und neutralisierenden TW-Antikörpertitern nach Impfung mit der derzeit etablierten HDCS-Vakzine seien die Daten genannt, die KUWERT und Mitarbeiter 1976 (68) in Impfstudien mit der HDCS-Vakzine ermittelten. Dreißig Personen, die sechsmal an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90 mit je 1 ml HDCS-Impfstoff vakziniert wurden, entwickelten bis Tag 14 nach Erstimpfung mit einer Ausnahme im MNT gemessene neutralisierende Anti-

körper (VB: 0,2 IU/ml - 11,4 IU/ml) und mit zwei Ausnahmen komplementbindende Akk (Titer: 1:8 - 1:512). Die höchsten kb. und neutralisierenden Titermittel wurden vier Wochen nach der ersten Impfung beobachtet. Die Persistenz neutralisierender Serumantikörper konnte bis Tag 450 nach Impfbeginn nachgewiesen werden, während zwischen dem 190. und 300. Tag noch etwa 75 % aller untersuchten Seren in der KBR positiv reagierten (68).

Hinsichtlich Serokonversionsrate (100 % in KBR und N-Test), frühen Auftretens neutralisierender Serumantikörper (HDCSV: 96,7 % am Tag 14, PCECV: 100 % am Tag 14) und erreichten Titerhöhen wird deutlich, daß die antikörperinduzierende Fähigkeit des neuen PCEC-Impfstoffes nach den hier erzielten Ergebnissen durchaus mit der bewährten HDCS-Vakzine vergleichbar ist.

Die im Essener post-expositionellen Impfschema am Tag 3 vorgesehene Vakzinegabe führte zu signifikant höheren neutralisierenden Ak-Titern an den Tagen 7 und 14 und zu einem signifikant höheren kb. Ak-Titer am Tag 14. KUWERT et al. haben 1978 wegen der nur kurzen Zugänglichkeit des TWV vor Erreichen des Nervensystems und der u.U. sehr kurzen Inkubationszeiten der Tollwut nach ZNS-naher Virusinokulation für die post-expositionelle Tollwutbehandlung das Auftreten neutralisierender Serumantikörper zu einem möglichst frühen Zeitpunkt gefordert. Der in diesem Sinne deutlich positive Effekt der PCECV-Gabe am Tag 3 läßt es weiterhin sehr wohl berechtigt erscheinen, das ursprünglich für den HDCS-Impfstoff erarbeitete post-expositionelle Immunisierungsschema auch für die PCEC-Vakzine zu empfehlen.

Ziel der Boosterimpfung am Tag 90 im Rahmen der post-expositionellen Impfprophylaxe ist neben der bewirkten

Titersteigerung eine Verlängerung der Antikörperpersistenz, um auch für mögliche Fälle mit längerer Inkubationszeit (bis zu einem Jahr und darüber) eine wirksame Prophylaxe zu erreichen. Signifikante Titersteigerungen durch Boosterimpfung mit PCEC-Impfstoff am Tag 90 im Vergleich zu den nicht geboosterten Probanden konnten in dieser Studie nachgewiesen werden. Für den Nachweis eines Effektes auf die Ak-Persistenz reichte der hier beschriebene Beobachtungszeitraum von einem halben Jahr nicht aus. LJUBICIC et al. (81) konnten bei 12 post-expositionellen und 5 prä-expositionellen Probanden die Persistenz neutralisierender Antikörper nach PCECV-Gabe über 365 Tage verfolgen.

3. Interferoninduktion

Interferon wurde 1957 zum erstenmal von ISAACS und LINDEN-MANN beschrieben (50). Es wird nach Stimulation durch RNS-Viren, synthetische doppelstrangige Ribonucleotide, Lipopolysaccharide und Proteine vorrangig in der Umgebung des Eintrittsortes des Stimulans (Inducer) gebildet und hat antivirale Aktivität. Sein physiologischer Wirkungsort ist vermutlich nahe der Bildungsstätte, um in deren Umgebung eingedrungenes Virus zu eliminieren. So fanden JANIS und HARMON (49) bei der Maus, daß der Muskel, in den der Interferoninducer Poly I: Poly C injiziert worden war, vier- bis achtmal mehr Interferon enthielt als sein kontralaterales Pendant.

BAER (10) konnte zeigen, daß Mäuse im Versuchsansatz, der die post-expositionelle Situation simulierte, nur durch solche Impfstoffe geschützt wurden, die zu hohen Seruminterferontitern führten. Exogenes Interferon oder Interferoninducer, die zusätzlich zu bei der Maus ansonsten

wirkungslosen Vakzinen nach Virusinokulation appliziert wurden, verbesserten deren Schutzkraft bis auf 100 %. Dabei erwies sich die lokale Interferongabe als wirkungsvoller als die systemische. HILFENHAUS et al. (42) konnten Cynomolgus-Affen allein durch die kombinierte Gabe von Humaninterferon aus peripheren Leukozyten intramuskulär und intralumbal vor einer starken Challengeinfektion mit Tollwutvirus schützen.

NICHOLSON et al. (95) fanden 1979 Seruminterferon bei insgesamt 30 von 42 Probanden nach Erstimpfung mit HDCS-Vakzine. Dabei wurde eine Dosisabhängigkeit beobachtet: nach 3 ml HDCSV waren 20 der 21 Geimpften IF-positiv, dagegen zeigten nur 10 der 21 mit 1 ml HDCSV Vakzinierten meßbare Seruminterferonspiegel.

Nach Applikation der neuen PCEC-Tollwutvakzine wurde Interferoninduktion bisher nur bei Primaten beobachtet. BARTH et al. (16) berichteten, daß 24 Stunden nach einer PCECV-Dosis alle 12 untersuchten Cynomolgusaffen Seruminterferontiter zwischen 1,2 und 12,0 IU/ml aufwiesen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß PCEC-Vakzine sehr wohl in der Lage ist, auch beim Menschen meßbare Seruminterferonspiegel zu induzieren. Wie auch bei den Arbeiten von NICHOLSON et al. (95) mit dem HDCS-Impfstoff konnte hier eine deutliche Dosisabhängigkeit beobachtet werden. Seruminterferon trat häufiger und mit höheren Titern nach der nur experimentell zur Anwendung kommenden dreifachen Dosierung auf. Die Bedeutung des Interferons bei der postexpositionellen Tollwutprophylaxe ist noch nicht abschließend geklärt. Vor dem Hintergrund der tierexperimentellen Arbeiten und der Befunde mit dem HDCS-Impfstoff unterstreicht die grundsätzliche Fähigkeit der PCEC-Tollwutvakzine zur Interferoninduktion jedoch deren Wertigkeit.

Die Interferonergebnisse dieser Studie aber sind es, die in besonderem Maße auf weitere interessante Fragestellungen hinweisen. Einmal wird bei den Probanden der Gruppe V (3fache PCECV-Dosis) deutlich, daß innerhalb des hier eingehaltenen Beobachtungszeitraumes von 30 Stunden post vaccinationem die Interferonserumpositivität noch keineswegs abgeschlossen ist. Zur Ermittlung der zeitlichen Begrenzung des Auftretens von Seruminterferon nach PCECV-Applikation wären also weitere Untersuchungen mit längerem Beobachtungszeitraum durchzuführen. Zum anderen legen die im Literaturteil dieser Arbeit zitierten Möglichkeiten der Reindarstellung von Tollwutvirus-untereinheiten die Frage nahe, welcher dieser verschiedenen Virusbestandteile vorrangig für die IF-Induktion durch PCEC- oder HDCS-Impfstoff verantwortlich ist.

Die Impfstudie, über die hier berichtet werden konnte, war als Langzeitstudie bei Niederschrift dieser Arbeit natürlich noch nicht abgeschlossen. Im weiteren Verlauf sollen

- a) die Antikörperpersistenz über einen längeren Zeitraum (1 - 5 Jahre) beobachtet,
- b) die Verträglichkeit der PCEC-Vakzine bei erneuter Anwendung ermittelt und
- c) die durch die nach einem Jahr vorgesehene Boosterimpfung zu erwartende erneute Titersteigerung überprüft werden.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Reaktogenität, Immunogenität und zur Eigenschaft der Interferoninduktion der neuen Purified Chick Embryo Cell-(PCEC-)Tollwutvakzine vorgestellt. Bei der Herstellung der PCEC-Vakzine wird der Tollwutvirusstamm Flury LEP-C 25 in primären Hühnerembryo-fibroblastenkulturen vermehrt und mit Betapropiolakton inaktiviert. Reinigung und Konzentration des Antigens werden durch kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation erreicht (Behringwerke AG).

Mit PCEC-Impfstoff wurden 88 gesunde Erwachsene (40 Frauen und 48 Männer) nach sechs verschiedenen Impfschemata vakziniert. Nebenwirkungen wurden durch die Probanden nach jeder Impfung auf Verträglichkeitsfragebögen protokolliert. Blutproben wurden vor und 7, 14, 21 oder 30, 90, 120 und 180 Tage nach Erstimpfung entnommen.

Über lokale Nebenwirkungen wurde nach 16,4 % aller Impfinjektionen berichtet, Allgemeinsymptome traten nach Angaben der Probanden nach 7,9 % der 292 PCECV-Applikationen auf. Hühnereiweißspezifische IgE-Antikörper konnten mittels Radio Allergo Sorbens Test (RAST) weder vor noch 30 Tage nach Impfbeginn nachgewiesen werden.

Neutralisierende Antikörper wurden im Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) bestimmt, alle Probandenserumproben wurden außerdem auch in der Komplementbindungsreaktion (KBR) untersucht. Alle 88 Impflinge entwickelten ohne Ausnahme hohe Serumgehalte neutralisierender und komplementbindender Antikörper. Im Plateaubereich der Antikörperkurve lagen die KBR-Titer zwischen 1:16 und 1:512 und die neutralisierenden Antikörperwerte zwischen 1,9 IU/ml und 127,9 IU/ml.

Bei Anwendung des post-expositionellen Impfschemas entwickelten bis zum Tag 7, also nach zweimaliger PCECV-Gabe, 15 von 29 Impflingen (52 %) neutralisierende Tollwut-Antikörper in einer Konzentration von 0,5 IU/ml oder mehr. Das geometrische Titermittel betrug am Tag 14 in derselben Gruppe 20,1 IU/ml.

Die Interferonbestimmung wurde auf menschlichen Fibroblastenkulturen durchgeführt, die trisomer hinsichtlich Chromosom 21 sind. Als Challengevirus diente Encephalomyocarditis-Virus. Zwanzig Stunden nach Applikation von 3 ml PCEC-Impfstoff wurde mit 7 von 10 der maximale Anteil IF-positiver Probanden beobachtet. Nach Applikation von nur 1 ml PCECV entwickelten dagegen nur 2 von 11 Impflingen meßbare IF-Titer.

Ein signifikant titersteigernder Effekt konnte für die PCECV-Gaben am Tag 3 und am Tag 90 nachgewiesen werden. Die Bedeutung der ersten liegt in der damit erreichten frühzeitigen und rasch ansteigenden Schutzwirkung, während die zweite für eine längere Antikörperpersistenz entscheidend ist. Das Essener post-expositionelle Impfschema mit Impfungen an den Tagen 0, 3, 7, 14, 30 und 90, das ursprünglich für die HDCS-Tollwutvakzine ausgearbeitet wurde, muß auch für die post-expositionelle Prophylaxe mit der PCEC-Vakzine empfohlen werden.

V. SUMMARY

BAER, J. (1986): Immunization Trial with Purified Chick Embryo Cell (PCEC) Rabies Vaccine - Reactogenicity, Antibody Response, and Induction of Interferon

In this study Purified Chick Embryo Cell (PCEC) rabies vaccine was examined for reactogenicity, antibody response, and its ability to induce seruminterferon. For the production of PCEC vaccine the Flury LEP-C 25 strain of rabies virus is propagated in primary chick embryo cell cultures and inactivated by beatpropiolactone. The antigen is purified and concentrated by continuous density gradient centrifugation (Behringwerke AG, Marburg, FRG).

PCEC vaccine was given to 88 healthy adults (40 women and 48 men) according to six different vaccination schedules. Side effects were reported on reactivity forms after each vaccination. Blood samples were taken before and 7, 14, 21 or 30, 90, 120 and 180 days after the first vaccination.

Local side effects were reported after 16.4 % of PCECV injections. General symptoms were recorded after 7.9 % of the 292 applications. IgE antibodies specific for chicken proteins determined by Radio Allergo Sorbens Test (RAST) could not be shown on days 0 or 30.

Neutralizing antibodies were determined by Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) and sera were tested for complement-fixing (CF) antibodies in parallel. With no exception, all 88 vaccinees developed high titers of complement-fixing and neutralizing antibodies. At the time of plateau formation of the antibody curve titers between 1:16 and 1:512 (CFT) and 1.9 IU/ml and 127.9 IU/ml (RFFIT), respectively, were obtained.

Employing the post-exposure vaccination schedule, neutralizing antibodies in a concentration of 0.5 IU/ml or more were found in 15 of 29 (52 %) vaccinees on day 7. GMT on day 14 was 20.1 IU/ml in the same group.

Serum interferon was determined with a neutral red dye-uptake assay on human fibroblasts, trisomic for chromosome 21, using encephalomyocarditis virus as challenge. Serum interferon reached a peak 20 hours after application of 3 ml PCEC vaccine in 7 of 10 volunteers tested, whereas only 2 of 11 persons having received just 1 ml of vaccine developed measurable IF titers.

A significantly increasing effect on the antibody titers could be shown for additional PCECV application on day 3 as well as on day 90. The first is important in order to achieve an early protection after exposure, the latter increases the period of antibody persistence. Thus, the Essen post-exposure vaccination schedule (vaccinations on day 0, 3, 7, 14, 30 and 90), originally elaborated for the HDGS rabies vaccine, has to be recommended for the PCEC vaccine, too.

VI. TABELLARISCHER ANHANG

Anhang 1: Fragebogen zur Erfassung der Reaktogenität

Name: Impfung am Tag

geb.:

Allgemeine Symptome	Tag 0 3. Std. 8.		Tag 1	Tag 2	Tag 3
Temperatur					
Kopfschmerzen					
gastrointestinal- nale Symptome					
Schwindel					
Müdigkeit					
andere					

Lokale Symptome	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Schmerzen				
Verhärtung				
Rötung				
Schwellung				

Bewertungsskala

0 = keine
1 = mild
2 = mäßig
3 = schwer

→ Fieber

0 = $\leq 37,5^\circ$
1 = $\leq 38,0^\circ$
2 = $\leq 39,0^\circ$
3 = $> 39,0^\circ$

Lokal (Quadrat d. Durchmessers)

0 = keine Reaktion
1 = 1 - 150 mm²
2 = 151 - 250 mm²
3 = > 250 mm²

Tabelle 21 : Häufigkeit des Auftretens subjektiv protokollierter Symptome 0 bis 3 Tage nach i.m.-Impfung mit PCEC-Vakzine, n =292 Applikationen.

Grad Parameter	0 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	Summe n (%)
Allgemeine Symptome					
Temperatur	277 (94,9)	13 (4,5)	2 (0,7)	0 (0,0)	292 (100)
Kopfschmerzen	253 (86,6)	23 (7,9)	14 (4,8)	2 (0,7)	292 (100)
Gastrointestinale Symptome	284 (97,3)	5 (1,7)	2 (0,7)	1 (0,3)	292 (100)
Schwindel	277 (94,9)	10 (3,4)	5 (1,7)	0 (0,0)	292 (100)
Müdigkeit	225 (77,1)	34 (11,6)	27 (9,2)	6 (2,1)	292 (100)
Andere	275 (94,2)	9 (3,1)	5 (1,7)	3 (1,0)	292 (100)
Lokale Symptome					
Schmerzen	131 (44,9)	116 (39,7)	42 (14,4)	3 (1,0)	292 (100)
Verhärtung	257 (88,0)	28 (9,6)	7 (2,4)	0 (0,0)	292 (100)
Rötung	265 (90,8)	25 (8,6)	2 (0,7)	0 (0,0)	292 (100)
Schwellung	274 (93,8)	13 (4,5)	5 (1,7)	0 (0,0)	292 (100)

Bewertungsskala

0 = keine
1 = mild
2 = mäßig
3 = schwer

Fieber

0 = $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$
1 = $\leq 38,0^{\circ}\text{C}$
2 = $\leq 39,0^{\circ}\text{C}$
3 = $> 39,0^{\circ}\text{C}$

Lokale Symptome⁺

0 = keine Reaktion
1 = 1 - 150 mm²
2 = 151 - 250 mm²
3 = $> 250 \text{ mm}^2$

⁺ Quadrat des Durchmessers

Tabelle 22 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere neutralisierende TW-Ak-Werte (IU/ml) im Serum der Probanden der Gruppe I. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den Tagen 0 - 3 - 7 - 14 - 30 - 90. Neutralisierende TW-Akk wurden mittels RFFIT bestimmt.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak-positiv	GMT	Variationsbreite	GMT $\pm$ s
0	15	0	—	—	—
7	15	86,7	0,2	< 0,1 - 1,5	0,1 - 0,6
14	15	100	13,8	2,8 - 58,2	5,5 - 34,7
30	14	100	13,5	3,4 - 127,9	5,1 - 35,5
90	13	100	6,0	1,5 - 17,3	3,0 - 12,3
120	11	100	13,9	3,1 - 33,4	7,2 - 26,3
180	8	100	3,4	1,4 - 12,8	1,6 - 6,3

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;
s = Standardabweichung

Tabelle 23 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere komplex-
mentbindende TW-Ak-Titer (reziproke Werte) im Serum der Probanden
der Gruppe I. Die Impfungen mit je 1 ml PCBC-Vakzine erfolgten an den
Tagen 0 - 3 - 7 - 14 - 30 - 90.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT $\pm$ s
0	15	0	—	—	—
7	15	0	—	—	—
14	15	80	14,6	< 8 - 128	3,2 - 79,4
30	14	100	87,1	16 - 256	38,9 - 195,0
90	13	100	35,8	8 - 128	17,4 - 72,4
120	11	100	94,1	32 - 256	47,9 - 182,0
180	8	87,5	11,3	< 8 - 64	3,2 - 38,9

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;

s = Standardabweichung

Tabelle 24 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere neutralisierende TW-Ak-Werte (IU/ml) im Serum der Probanden der Gruppe II.
Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den Tagen
0 - 7 - 14 - 30 - 90.
Neutralisierende TW-Akk wurden mittels RFFIT bestimmt.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT $\pm$ s
0	19	0	—	—	—
7	19	78,9	0,3	< 0,1 - 2,0	0,1 - 0,7
14	18	100	11,8	1,2 - 57,1	3,0 - 45,7
30	18	100	11,8	1,9 - 57,1	4,6 - 30,2
90	17	100	5,6	1,5 - 70,3	2,3 - 13,5
120	10	100	13,1	4,2 - 47,5	5,6 - 30,9
180	9	100	6,5	2,1 - 12,8	3,3 - 12,6

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;
s = Standardabweichung

Tabelle 25 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere komplettbindende TW-Ak-Titer (reziproke Werte) im Serum der Probanden der Gruppe II. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den Tagen 0 - 7 - 14 - 30 - 90.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT ± s
0	19	0	—	—	—
7	19	0	—	—	—
14	18	50	5,0	< 8 - 256	8 - 33,9
30	18	94,4	54,9	< 8 - 256	12,3 - 245,5
90	17	100	34,7	8 - 128	15,8 - 75,9
120	10	100	68,5	32 - 128	40,3 - 116,3
180	9	100	27,4	16 - 64	17,7 - 42,4

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;

s = Standardabweichung

Tabelle 26 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere neutralisierende TW-Ak-Werte (IU/ml) im Serum der Probanden der Gruppe III.
Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den Tagen
0 - 3 - 7 - 14 - 30.
Neutralisierende TW-Akk wurden mittels RFFIT bestimmt.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT ± s
0	14	0	—	—	—
7	14	92,9	0,8	< 0,1 - 3,1	0,4 - 2,0
14	14	100	30,0	2,3 - 189	9,6 - 95,5
30	14	100	16,5	4,2 - 52,1	7,6 - 36,3
90	11	100	9,0	1,9 - 77,0	2,7 - 28,8
120	9	100	4,9	1,0 - 15,4	1,9 - 12,3
180	7	100	2,0	0,5 - 12,8	0,8 - 5,5

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;
s = Standardabweichung

Tabelle 27 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere komplex-
mentbindende TW-Ak-Titer (reziproke Werte) im Serum der Probanden
der Gruppe III. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten
an den Tagen 0 - 3 - 7 - 14 - 30.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT + s
0	14	0	-	-	-
7	14	0	-	-	-
14	14	100	82,0	8 - 256	36,6 - 182,0
30	14	100	110,4	64 - 256	74,6 - 163,3
90	11	100	49,7	16 - 128	23,8 - 103,8
120	9	100	23,5	8 - 64	11,8 - 46,9
180	7	71,4	8,8	< 8 - 64	1,7 - 45,1

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;

s = Standardabweichung

Tabelle 28: Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere neutralisierende TW-Ak-Werte (IU/ml) im Serum der Probanden der Gruppe IV. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den Tagen 0 - 7 - 14 - 30. Neutralisierende TW-Akk wurden mittels RFFIT bestimmt.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak-positiv	GMT	Variationsbreite	GMT $\pm$ s
0	19	0	—	—	—
7	19	84,2	0,4	< 0,1 - 1,9	0,2 - 0,9
14	17	100	10,9	1,3 - 50,9	3,4 - 35,5
30	17	100	15,2	5,1 - 57,1	7,1 - 32,4
90	13	100	10,3	2,8 - 104	3,7 - 28,2
120	13	100	7,5	1,9 - 71,9	2,8 - 20,9
180	10	100	2,9	0,5 - 12,8	1,0 - 8,5

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;

s = Standardabweichung

Tabelle 29 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere komplex-
mentbindende TW-Ak-Titer (reziproke Werte) im Serum der Probanden
der Gruppe IV. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten
an den Tagen 0 - 7 - 14 - 30.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT $\pm$ s
0	19	0	—	—	—
7	19	0	—	—	—
14	17	88,2	30,7	< 8 - 512	5,8 - 166,7
30	17	100	100,3	16 - 512	36,6 - 275,4
90	13	100	67,5	32 - 256	34,8 - 131,8
120	14	100	52,5	8 - 512	17,2 - 162,2
180	10	90	21,1	< 8 - 128	5,4 - 81,3

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;

s = Standardabweichung

Tabelle 30 : Relativer Anteil TW-Ak positiver Probanden (%) und mittlere neutralisierende TW-Ak-Werte (IU/ml) im Serum der Probanden der Gruppe V. Die Impfungen erfolgten am Tag 0 mit 3 ml PCEC-Vakzine und an den Tagen 7 und 21 mit je 1 ml PCEC-Vakzine. Neutralisierende TW-Ak wurden mittels RFFIT bestimmt.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT + -	s
0	10	0	-	-	-	-
7	10	100	0,6	0,1 - 1,5	0,2 - 1,3	
14	8	100	21,5	5,2 - 38,6	11,2 - 40,7	
21	10	100	16,5	3,1 - 18,9	4,8 - 57,5	
90	9	100	5,7	1,0 - 14,0	2,6 - 12,9	
120	6	100	3,1	1,0 - 5,2	1,8 - 5,6	
180	3	100	2,5	1,1 - 5,7	1,1 - 5,8	

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel
s = Standardabweichung

Tabelle 31 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere komplettbindende TW-Ak-Titer (reziproke Werte) im Serum der Probanden der Gruppe V. Die Impfungen erfolgten am Tag 0 mit 3 ml PCEC-Vakzine und an den Tagen 7 und 21 mit je 1 ml PCEC-Vakzine.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT + s
0	10	0	-	-	-
7	10	0	-	-	-
14	8	100	108,4	32 - 256	57,5 - 199,5
21	10	100	127,9	32 - 512	47,5 - 346,7
90	9	100	37,3	8 - 128	17,4 - 79,4
120	7	85,7	26,2	< 8 - 128	5,4 - 128,8
180	3	100	25,3	16 - 64	11,2 - 56,2

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;
s = Standardabweichung

Tabelle 32 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere neutralisierende TW-Ak-Werte (IU/ml) im Serum der Probanden der Gruppe VI. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den Tagen 0 - 7 - 21. Neutralisierende TW-Akk wurden mittels RFFIT bestimmt.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak-positiv	GMT	Variationsbreite	GMT + s
0	11	0	—	—	—
7	11	63,6	0,2	< 0,1 - 0,7	0,1 - 0,5
14	11	100	4,9	0,8 - 57,1	1,2 - 20,0
21	11	100	6,5	1,9 - 31,4	2,7 - 15,8
90	9	100	2,8	1,9 - 5,1	2,0 - 4,0
120	7	100	3,0	1,3 - 6,3	1,6 - 5,5
180	8	100	0,8	0,5 - 2,6	0,4 - 1,3

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;

s = Standardabweichung

Tabelle 33 : Relativer Anteil TW-Ak-positiver Probanden (%) und mittlere komplex-
mentbindende TW-Ak-Titer (reziproke Werte) im Serum der Probanden der
Gruppe VI. Die Impfungen mit je 1 ml PCEC-Vakzine erfolgten an den
Tagen 0 - 7 - 21.

Tage nach der ersten Impfung	n	% Ak- positiv	GMT	Variations- breite	GMT + s
0	11	0	—	—	—
7	11	0	—	—	—
14	11	90,9	21,9	< 8 - 128	5,2 - 91,2
21	11	100	46,6	16 - 128	22,9 - 95,2
90	10	90	17,0	< 8 - 64	5,1 - 56,2
120	5	100	24,2	16 - 32	16,2 - 35,5
180	6	50	3,6	< 8 - 16	< 8 - 14,8

n = Anzahl Probanden; GMT = geometrisches Titermittel;
s = Standardabweichung

Anhang 2: Rezeptur des Veronalpuffers nach MAYER (85)

Lösung A

Natriumchlorid	83,80 g
Natriumbikarbonat	2,52 g
Veronal-Na (Natriumsalz der 5,5-Diethylbarbitursäure)	3,00 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Lösung B

Veronal (5,5-Diethylbarbi- tursäure)	4,60 g
Magnesiumchlorid + 6 H ₂ O	1,00 g
Kalziumchlorid + 2 H ₂ O	0,20 g
Aqua bidest. (heiß)	ad 500,00 ml

Pufferkonzentrat

Lösung B wird gekühlt, Lösung A hinzugefügt, mit Aqua bidest. auf 2000 ml verdünnt und sterilisiert.

Puffer

Das Pufferkonzentrat wird 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

Anhang 3: Rezeptur der Hämoglobin-Transformationslösung

Natriumbikarbonat	1,00 g
Kalium-hexacyano-ferrat (III) ($K_3(Fe(CN)_6)$)	0,20 g
Kaliumcyanid	0,05 g
Aqua bidest.	1000,00 ml

Anhang 4: Rezeptur des Zellwachstumsmediums

Bestandteile

1. Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen;
2. Glutamin, 200 mM, 10fach konz. Lösung, bei + 4°C aufbewahrt;
3. Natriumbikarbonat, 5,5%ige Lösung;
4. fetales Kälberserum, bei - 20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde das Serum 30 Min. bei + 56°C inaktiviert, danach bei + 4°C gelagert.
5. Antibiotikum: Gentamycin (Rifobacin 80), 80 mg/2 ml.

Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen wurde mit den oben aufgeführten Substanzen bis zum Erreichen der folgenden Endkonzentrationen ergänzt:

fetales Kälberserum	10,0 %
Natriumbikarbonatlsg.	4,5 %
Glutaminlsg.	1,0 %
Gentamycin	40 µg/ml.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. AFSHAR, A. (1979): A Review of Non-Bite Transmission of Rabies Virus Infection.
Brit. Vet. J. 135, 142-148
2. AJJAN, N., J.P. SOULEBOT, C. STELLMANN, G. BIRON, C. CHARBONNIER, R. TRIAU, C. MERIEUX (1978): Résultats de la vaccination antirabique préventive par la vaccin inactif concentré souche rabies PM/W138-1053-3 M cultivée sur cellules diploïdes humaines. Obtention d'immunoglobuline hyperimmune mixte antirabique et antitétanique par plasmaphérese des étudiants vétérinaires vaccins.
Dev. Biol. Stand. 40, 89-100
3. ANDERS, W. (1966): Tollwut 1965.
Bundesgesundhbl. 9, 270-272
4. ANILIONIS, A., W.H. WUNNER, P.J. CURTIS (1981): Structure of the glycoprotein gene in rabies virus.
Nature 294, 275-278
5. ATANASIU, P. (1967): Connaissances et Techniques actuelles sur la Rage.
Path. Biol. 15, 1103-1118
6. ATANASIU, P. (1973): Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin.
In: KAPLAN, M.M., H. KOPROWSKI (Eds.): Laboratory Techniques in Rabies, 3rd Ed., pp. 314-318, WHO Monograph Series No. 23
7. BABES, V., L. LEPP (1889): Recherches sur la vaccination antirabique.
Ann. Inst. Pasteur 3, 384-395
8. BAER, G.M., T.R. SHANTAVEERAPPA, G.H. BOURNE (1965): Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats.
Bull. W.H.O. 33, 783-794

9. BAER, G.M. (1975): Pathogenesis to the central nervous system.
In: BAER, G.M. (Ed.): The Natural History of Rabies, pp. 181-198, Academic Press, New York
10. BAER, G.M. (1985): Defense mechanisms against rabies unrelated to specific immunity.
In: VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.): Improvements in rabies post-exposure treatment, pp. 15-23, Zagreb Institute of Public Health, Zagreb
11. BAHMANYAR, M. (1974): Results of antibody profiles in man vaccinated with the HDCS vaccine with various schedules.
Symp. Ser. Immunobiol. Standard 21, 231-239
12. BAHMANYAR, M., A. FAYAZ, S. NOUR-SAHELI, M. MO-HAMMADI, H. KOPROWSKI (1976): Successful protection of humans exposed to rabies infection. Postexposure treatment with the new human diploid cell rabies vaccine and antirabies serum.
J. Am. med. Ass. 236, 2751-2754
13. BALTAZARD, M., M. GHODSSI (1954): Prevention of human rabies - treatment of persons bitten by rabid wolves in Iran.
Bull. W.H.O. 10, 797-803
14. BARTH, R., E. GROSS-ALBENHAUSEN, O. JAEGER, L. MILCKE (1981): The antibody binding test, a useful method for quantitative determination of in-activated rabies virus antigen.
J. Biol. Stand. 9, 81-89
15. BARTH, R., H. GRUSCHKAU, O. JAEGER, L. MILCKE (1982): Purification and evaluation of rabies virus antigen.
Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis. 5, 211-216

16. BARTH, R., H. GRUSCHKAU, U. BIJOK, J. HILFENHAUS, J. HINZ, L. MICKE, H. MOSER, O. JAEGER, H. RONNEBERGER, E. WEINMANN (1984): A new inactivated tissue culture rabies vaccine for use in man - Evaluation of PCEC vaccine by laboratory tests.
J. Biol. Stand. 12, 29-46

17. BARTH, R., H. GRUSCHKAU, O. JAEGER, H. MILCKE, E. WEINMANN (1984): Purified chick embryo cell (PCEC) rabies vaccine for human use.
Laboratory data.
Behring Inst. Mitt. No. 76, 142-154

18. BIJOK, U. (1985): Purified Chick Embryo Cell (PCEC) Rabies Vaccine - A Review of the Clinical Development 1982-1984.
In: VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.): Improvements in rabies post-exposure treatment, pp. 103-111, Zagreb Institute of Public Health, Zagreb

19. BINDRICH, H., E. KUWERT (1957): Die diagnostische Bedeutung der Komplementbindungsreaktion bei Tollwut.
Arch. exp. Veterinärmed. 11, 1015-1034

20. BOHLMANN, H.G. (1968): Schwere bleibende Schädigung nach Tollwutschutzimpfung mit der Hempt-Vakzine.
Med. Klinik 63, 1932-1934

21. BUNDESGESUNDHEITSAMT (Hrsg.) (1970): Tollwut, Verhütung und Bekämpfung, Merkblatt Nr. 3.
Dtsch. Ärztebl. 67, 1693-1700

22. BUNDESGESUNDHEITSAMT (Hrsg.) (1978): Tollwut, Verhütung und Bekämpfung, Merkblatt No. 3.
Bundesgesundheitsbl. 21, 289-295

23. BUNDESGESUNDHEITSAMT (Hrsg.) (1985): Tollwut, Verhütung und Bekämpfung, Merkblatt Nr. 3.
Bundesgesundheitsbl. 28, 150-155

24. CABASSO, V.J., J.C. LOOFBOUROW, R.E. ROBY, W. ANUSKIEWICZ (1971): Rabies immune globulin of human origin. Preparation and dosage determination in non-exposed volunteer subjects.
Bull. W.H.O. 45, 303-315
25. CABASSO, V.J., M.B. DOBKIN, R.E. ROBY, A.H. HAMMAR (1974): Antibody response to a human diploid cell rabies vaccine.
Appl. Microbiol. 27, 553-561
26. COONS, A.H., H.J. CREECH, R.N. JONES, E. BERLINER (1942): The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45, 159-170.
27. COX, J.H. (1982): The Structural Proteins of Rabies Virus.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 5, 21-25
28. CRICK, J. (1985): Rabies Virus Genome.
In: KUWERT, E., C. MERIEUX, H. KOPROWSKI, K. BÖGEL (Eds.): Rabies in the Tropics, pp. 13-20, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio
29. DEAN, D.J., W.M. EVANS, R.C. McCIURE (1963): Pathogenesis of rabies.
Bull. W.H.O. 29, 803-811
30. DIETZSCHOLD, B., J.H. COX, G. SCHNEIDER (1978): Structure and function of rabies virus glycoprotein.
Dev. Biol. Stand. 40, 45-55
31. DU PONT, J.R., K.M. EARLE (1965): Human rabies encephalitis. A study of forty-nine fatal cases with review of the literature.
Neurology 15, 1023-1034
32. FERMI, C. (1908): Über die Immunisierung gegen Wutkrankheit.
Z. Hyg. Infektkr. 58, 237-276

33. GALIAN, A., J.M. GUERIN, M. LAMOTTE, Y. LE CHARPENTIER, J. MIHOL, J.B. DUREUX, D. GERARD, E. DE LAVERGNE, P. ATANASIU, P. RAVISSE, P. SUREAU (1980): Human-to-Human Transmission of Rabies Via a Corneal Transplant-France.
Morb. Mortal. Weekly Rep. 29, 25-26
34. GOLDWASSER, R.A., R.E. KISSLING (1958): Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 219-223
35. HAASE, M., D. SEINSCHKE, W. SCHNEIDER (1985): The mouse neutralization test in comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test: differences in the results in rabies antibody determinations.
J. Biol. Stand. 13, 123-128
36. HABEL, K. (1945): Seroprophylaxis in experimental rabies.
Pbl. Hlth. Rep. Wash. 60, 545-560
37. HALONEN, P.E., F.A. MURPHY, B.N. FIELDS, D.R. REESE (1968): Haemagglutination of rabies and some other bullet-shaped viruses.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 127, 1037-1042
38. HATTWICK, M.A.W., T.T. WEISS, J. STECHSCHULTE, G.M. BAER, M.G. GREGG (1972): Recovery from Rabies: A Case Report.
Ann. Intern. Med. 76, 931-942
39. HATTWICK, M.A.W., L. COREY, W.B. CREECH (1976): Clinical Use of Human Globulin Immune to Rabies Virus.
J. Infect. Dis. 133, A266-A272
40. HEMPT, A. (1925): Sur une méthode rapide de traitement antirabique.
Ann. Inst. Pasteur 39, 632-640
41. HEMPT, A. (1938): Über eine karbolisierte antirabische Aether-Vaccine und ihren Schutzwert bei Mensch und Tier.
Mitt. Behringwerke 9, 150-209

42. HILFENHAUS, J., H.E. KARGES, E. WEINMANN, R. BARTH (1975): Effect of Administered Human Interferon on Experimental Rabies in Monkeys.
Infect. Immun. 5, 1156-1158
43. HILFENHAUS, J., R. KÖHLER, R. BARTH, M. MAJER, R. MAULER (1976): Large-scale purification of animal viruses in the RK-model zonal ultracentrifuge. I. Rabies virus.
J. Biol. Stand. 4, 263-271
44. HILFENHAUS, J. R. ACKERMANN (1981): Endogenous Interferon in the Cerebrospinal Fluid of Herpes Encephalitis Patients (41047).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 166, 205-209
45. HORZINEK, M. (1985): Kompendium der allgemeinen Virologie.
Schriftenreihe "Pareys Studentexte" Nr. 4, 2. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
46. HOUFF, S.A., R.C. BURTON, R.W. WILSON, T.E. HENSON, W.T. LONDON, G.M. BAER, L.J. ANDERSON, W.G. WINKLER, D.L. MADDEN, J.L. SEVER (1979): Human-to-Human Transmission of Rabies Virus by Corneal Transplant.
N. Engl. J. Med. 300, 603-604
47. HSIUNG, G.D. (1964): Diagnostic Virology.
Yale University Press, New Haven und London
48. HUMMELER, K., N. TOMASSINI, F. SOKOL, E. KUWERT, H. KOPROWSKI (1968): Morphology of the Nucleoprotein Component of Rabies Virus.
J. Virol. 2, 1191-1199
49. JANIS, B., N.W. HARMON (1976): Therapy of murine rabies after exposure: efficacy of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid alone and in combination with three rabies vaccines.
In: U.S. Dept. of Health (Ed.): Symposium on Advances in Rabies Research, Welfare, Atlanta

50. ISAACS, A., J. LINDENMANN (1957): Virus interference.
I. The interferon.
Proc. Roy. Soc. Ser. B 147, 258-267
51. JANSSEN, E.G. (1970): Tollwutschutzimpfung mit töd-
lichem Ausgang.
Mschr. Kinderheilk. 118, 379-380
52. KAPLAN, N.M., D. COHEN, H. KOPROWSKI (1962): Studies
on the local treatment of wounds for pre-
vention of rabies.
Bull. W.H.O. 26, 765-775
53. KISSLING, R.E. (1958): Growth of rabies virus in
non-nervous tissue culture.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 98, 223-225
54. KOPROWSKI, H., H.R. COX (1947): Studies on rabies
infection in developing chick embryos.
J. Bact. (Baltimore) 54, 74
55. KOPROWSKI, H., J. LEBELL (1950): The presence of
complement-fixing antibodies against brain
tissue in sera of persons, who had received
antirabies vaccine treatment.
Amer. J. Hyg. 51, 292-299
56. KOPROWSKI, H., J. VAN DER SCHEER, J. BLACK (1950):
Use of hyperimmune antirabies serum con-
centrates in experimental rabies.
Am. J. Med. 8, 412-420
57. KOPROWSKI, H. (1973): The mouse inoculation test.
In: KAPLAN, M.M., H. KOPROWSKI (Eds.): La-
boratory Techniques in Rabies, 3rd Ed.,
pp. 85-93, WHO Monograph Series No. 23,
Geneva
58. KÖTTGEN, U. (1970): Beobachtungen bei einem toll-
wutkranken Kind.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., Suppl. 3, 44-47

59. KUWERT, E., W. KLOSTERKÖTTER, G. LINZENMEIER (1967): Neurologische Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung mit Hempt'vaccine in der Bundesrepublik (1955-1966).
In: Kongreßbericht über die III. Tagung der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft e.v., 20.-24. April 1967, Hamburg, Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien
60. KUWERT, E. (1967): Versuche zur Antigenität, Schutzkraft und Encephalitogenität der Hempt-Vaccine sowie Betrachtungen zur Tollwutschutzimpfung in Deutschland.
Arch. Hyg. 151, 130-145
61. KUWERT, E., T.J. WIKTOR, F. SOKOL, H. KOPROWSKI (1968): Haemagglutination by Rabies Virus.
J. Virol. 2, 1381-1392
62. KUWERT, E., W. KLOSTERKÖTTER, G. LINZENMEIER (1968): Neurologische Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung.
Med. Klinik 63, 1326-1328
63. KUWERT, E. (1969): Das Tollwutvirus.
Dt. med. Wschr. 94, 1697-1703
64. KUWERT, E. (1970): Neue Befunde zur Struktur und Vermehrung des Tollwutvirus.
Zbl. Bakteriol., I. Abt. Orig., Suppl. 3, 1-22
65. KUWERT, E., I. MARCUS, O. THRAENHART, H. STAUDACHER (1972): Prä- und postinfektionelle Tollwutschutzimpfung.
Dtsch. med. Wschr. 97, 1893-1898
66. KUWERT, E. (1973): The complement fixation test.
In: KAPLAN, M.M., H. KOPROWSKI (Eds.): Laboratory Techniques in Rabies, 3rd Ed., pp. 124-134, WHO Monograph Series No. 23, Geneva

67. KUWERT, E. (1973): Haemagglutination and haemagglutination-inhibition tests.
In: KAPLAN, M.M., H. KOPROWSKI (Eds.): Laboratory Techniques in Rabies, 3rd Ed., pp. 135-146, WHO Monograph Series No. 23, Geneva
- 67a. KUWERT, E., P.G. HÖHER, R. FRÖSCHER, I. MARCUS, O. THRAENHART (1975): Verträglichkeit und Immunogenität eines attenuierten Influenza-Lebendimpfstoffes beim Menschen.
Dtsch. med. Wschr. 100, 2629-2635
68. KUWERT, E.K., I. MARCUS, P.G. HÖHER (1976): Neutralizing and complement-fixing antibody responses in pre- and post-exposure vaccinees to a rabies vaccine produced in human diploid cells.
J. Biol. Stand. 4, 249-262
69. KUWERT, E.K., I. MARCUS, P.G. HÖHER, J. WERNER, A. IWAND, E.B. HELM (1977): Immunogenität, Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Tollwutgewebekulturvakzine (HDGS-Impfstoff) beim Menschen. Empfehlungen für den prophylaktischen und postexpositionellen Einsatz (Impfschemata).
Med. Klinik 72, 797-805
70. KUWERT, E.K., I. MARCUS, J. WERNER, A. IWAND, O. THRAENHART (1978): Some experiences with human diploid cell strain- (HDGS-)rabies vaccine in pre- and post-exposure vaccinated humans.
Develop. Biol. Stand., Vol. 40, pp. 79-88, S. Karger, Basel
71. KUWERT, E.K., I. MARCUS, J. WERNER, V.J. CABASSO (1978): Immunization against rabies with rabies immune globulin, human (RIGH) and a human diploid cell strain (HDGS) rabies vaccine.
J. Biol. Stand. 6, 211-219
72. KUWERT, E.K. (1978): Passive Immunisierung gegen Tollwut.
Immunität und Infektion 6, 53-61
73. KUWERT, E., N. SCHEIERMANN (1984): Rhabdoviren.
In: BRANDIS, H., H.J. OTTE (Hrsg.): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 5. Aufl., S. 653-658, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

74. KUWERT, E., N. SCHEIERMANN (1985): Rabies: Post-exposure prophylaxis in man.
Ann. Inst. Pasteur/Virol. 136E, 425-445
75. KUWERT, E., R. TRIAU, O. THRAENHART (1985): Innocuity and side effects of human diploid cell rabies vaccine: Rationale and facts after vaccination of 500.000 persons.
In: KUWERT, E., CH. MERIEUX, H. KOPROWSKI, K. BÖGEL (Eds.): Rabies in the Tropics, Proceedings of the International Meeting in Tunis, 3.-7. October 1983, Springer Verlag Heidelberg
76. KUWERT, E.K., N. SCHEIERMANN (1986): Tollwut.
In: GSELL, O., U. KRECH, W. MOHR (Hrsg.): Klinische Virologie, S. 226-235, Urban & Schwarzenberg, München
77. LAFRENTZ, M., J. KÜLZ (1975): EEG-Veränderungen im Verlauf der Tollwutschutzbehandlung mit Hempt-Vakzine.
Münch. med. Wschr. 117, 1165-1166
78. LINZENMEIER, G., E. KUWERT (1969): Neurokomplikationen nach HEMPT-Impfung 1967/1968 in der Bundesrepublik.
Vortrag auf dem Tollwutsymposium der Dtsch. Ges. Hyg. Mikrobiol., Frankfurt/Hoechst, April 1969
79. LINZENMEIER, G., E. KUWERT (1970): Die Encephalitogenität der Hempt-Vakzine beim Menschen. Neurologische Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung in der Bundesrepublik von 1955 bis 1968.
Zbl. Bakteriolog., I. Abt. Orig., Suppl. 3, 102-117
80. LJUBICIC, M., J. VODOPIJA, S. SMERDEL, Z. BAKLAIC, M. SVJETLICIC, M. LOJKIC (1985): Efficacy of PCEC vaccine in post-exposure rabies prophylaxis.
In: VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.): Improvements in rabies post-exposure treatment, pp. 95-101, Zagreb Institute of Public Health, Zagreb

81. LJUBICIC, M., J. VODOPIJA, Z. BAKLAIC, M. SVETLICIC, S. SMERDEL (1985): Experience with PCEC Rabies Vaccine in Healthy Adults.
In: VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.): Improvements in rabies post-exposure treatment, pp. 77-84, Zagreb Institute of Public Health, Zagreb
82. LOUIE, R.E., M.B. DOBKIN, P. MEYER, B. CHIN, R.E. ROBY, A.H. HAMMAR, V.J. CABASSO (1975): Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test (MNT) with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT).
J. Biol. Stand. 3, 365-373
83. MACFARLANE, J.O., C.G. CULBERTSON (1954): Attempted production of allergic encephalomyelitis with duck embryo suspensions and vaccines.
Canad. J. Publ. Hlth. 45, 28-29
84. MAJER, M., J. HILFENHAUS, R. MAULER, W. HENNESSEN (1978): Ein gereinigter Tollwut-Impfstoff aus menschlichen diploiden Zellkulturen.
Münch. med. Wschr. 120, 287-288
85. MAYER, M.M. (1961): Complement and Complement Fixation.
In: KABAT, E.A., M.M. MAYER, 2nd Ed., Charles C. Thomas, Springfield III, USA
86. MELNICK, J.L., R.M. McCOMBS (1966): Classification and Nomenclature of Animal Viruses.
Progr. med. Virol. 8, 400-409
87. MERTZ, G.J., K.E. NELSON, V. VITHAYASAI, S. HAKORN-KAWAYOON, E.J. ROSANOFF, H. TINT, T.J. WIKTOR (1982): Antibody Responses to Human Diploid Cell Vaccine for Rabies With and Without Human Rabies Immune Globulin.
J. Infect. Dis. 145, 720-727
88. MIESSNER, H. (1948): Tierseuchen und ihre Bekämpfung.
Verlag M. & H. Schaper, Hannover

89. MOREAU, R. (1985): La rage de l'antiquité au siècle des lumières.
In: Pasteur et la rage, pp. 19-28, Informations Techniques des Services Veterinaires, Paris
90. MURPHY, F.A., S.P. BAUER, A.K. HARRISON, W.C. WINN (1973): Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system.
Lab. Invest. 28, 361-376
91. MURPHY, F.A., A.K. HARRISON, W.C. WINN, S.P. BAUER (1973): Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissue.
Lab. Invest. 29, 1-16
92. MURPHY, F.A., S.P. BAUER (1974): Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system.
Interviol. 3, 256-268
93. MURPHY, F.A. (1977): Rabies Pathogenesis.
Archives of Virology 54, 279-297
94. MÜLLER, E. (1908): Über akute Paraplegien nach Wutschutzimpfungen.
Dtsch. Z. Nervenheilk. 34, 252-278
95. NICHOLSON, K.G., E.K. KUWERT, J. WERNER, P. HARRISON (1979): Interferon response to human diploid cell strain rabies vaccine in man.
Arch. Virol. 61, 35-39
96. OSTERKORN, K. (1982): Biometrische Methoden.
In: MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. MAYR-BIBRACK, G. WITTMANN (Hrsg.): Virologische Arbeitsmethoden, Bd. IV, S. 115-323, Gustav Fischer Verlag, Jena
97. PAMPUS, I., H. WAHLE (1964): Über die neurologischen Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung.
Fortsch. Neurol. Psychiat. 32, 165-188
98. PASTEUR, L. (1881): Sur la rage.
C.R. Acad. Sci. 92, 1259-1260

99. PASTEUR, L. (1885): Méthode pour prévenir la rage après morsure.
C.R. Acad. Sci. 101, 765-774
100. PECK, F.B., H.M. POWELL, C.G. CULBERTSON (1955):
A new antirabies vaccine for human use.
J. Lab. & Clin. Med. 45, 679-683
101. PELSER, W.A. (1920): Zur Klinik, Kasuistik und Pathogenese der nervösen und psychischen Störungen im Gefolge der Wutschutzimpfung.
Z. Neurol. (Berlin) Ref. 22, 1-4 und 121-141
102. PHARMACIA DIAGNOSTICS (1984): Phadebas RAST^R Radioimmunoassay, Gebrauchsinformation, Allergenliste.
Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg
103. PLOTKIN, S.A., T.J. WIKTOR, H. KOPROWSKI, E.J. ROSANOFF, H. TINT (1976): Immunization schedules for the new human diploid cell vaccine against rabies.
Am. J. Epidemiol. 103, 75-80
104. PLOTKIN, S.A., T.J. WIKTOR (1978): Rabies vaccination.
Ann. Rev. Med. 85, 44-48
105. PORRAS, C., J.J. BARBOZA, E. FUENZALIDA, H. LOPES ADAROS, A.M.O. DIAZ, J. FURST (1976): Recovery from Rabies in Man.
Ann. Intern. Med. 85, 44-48
106. POWELL, H.M., C.G. CULBERTSON (1950): Cultivation of Fixed Rabies Virus in Embryonated Eggs.
Publ. Health Rep. 65, 400-401
107. REMLINGER, P. (1903): Le passage du virus rabique à travers les filtres.
Ann. Inst. Pasteur 17, 834-849

108. REMLINGER, P. (1905): Accidents paralytiques ou cours du traitement antirabique.
Ann. Inst. Pasteur 19, 625-646
109. REMLINGER, P. (1928): Les paralysies du traitement antirabique.
Ann. Inst. Pasteur 42, Suppl., 71-132
110. ROLLE, M., A. MAYR (Hrsg.) (1984): Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
111. ROSSET, R. (1985): Les premières vaccinations.
In: Pasteur et la rage, pp. 57-58, Informations Techniques des Services Veterinaires, Paris
112. ROUMIANTZEFF, M., N. AJJAN, B. MONTAGNON, J.C. VINCENT-FALQUET (1985): Rabies vaccines produced in cell culture.
Paper presented to Symposium on Vaccines and Vaccinations, Institut Pasteur, 4-7 June 1985
113. RUBIN, R.H., M.A.W. HATTWICK, S. JONES, M.B. GREGG, V.D. SCHWARTZ (1973): Adverse reactions to duck embryo rabies vaccine. Range and incidence.
Ann. Intern. Med. 78, 643-649
114. SCHEIERMANN, N. (1983): Untersuchungen zur passiven und aktiven Immunisierung gegenüber dem Hepatitis B Virus.
Habilitationsschrift, Universitätsklinikum Essen - Gesamthochschule
115. SCHLENSKA, K.G. (1976): Neurological complications following rabies duck embryo vaccination.
J. Neurol. 214, 71-74
116. SCHLUMBERGER, H.D., L.G. SCHNEIDER, H.P. KULAS, H. DIRINGER (1973): Gross chemical composition of strain Flury HEP rabies virus.
Z. Naturforsch. 28c, 103-104

117. SCHNEIDER, L.G. (1964): Erfahrungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut.
Zbl. Vet. Med. Reihe B 11, 207-230
118. SCHNEIDER, L.G. (1969): The cornea test, a new method for the intra vitam diagnosis of rabies.
Zbl. Vet. Med. Reihe B 16, 24-31
119. SCHNEIDER, L.G. (1969): Die Pathogenese der Tollwut bei der Maus. I. Die Virusausbreitung vom Infektionsort zum Zentralnervensystem.
Zbl. Bakt. 211, 281-308
120. SCHNEIDER, L.G. (1969): Die Pathogenese der Tollwut bei der Maus. II. Die Virusausbreitung innerhalb des ZNS.
Zbl. Bakt. 212, 1-13
121. SCHNEIDER, L.G., H. DIRINGER (1976): Structure and Molecular Biology of Rabies Virus.
In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 75, pp. 153-180, Springer Verlag, Berlin
122. SCHNEIDER, L.G. (1978): Struktur und antigener Aufbau des Tollwutvirus.
Münch. med. Wschr. 120, 279-280
123. SEDWICK, W.D., T.J. WIKTOR (1967): Reproducible plaquing system for rabies lymphocytic choriomeningitis and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/13S agarose suspension.
J. Virol. 1, 1224-1226
124. SEHGAL, S., H.O. GUPTA (1985): Prospects of tissue culture antirabies vaccine in India.
In: KUWERT, E., C. MERIEUX, H. KOPROWSKI, K. BÖGEL (Eds.): Rabies in the Tropics, Proceedings of the International Meeting in Tunis, 3.-7. October 1983, Springer Verlag, Heidelberg, pp. 671-674

125. SEHGAL, S. (1985): Report of the trials of PCEC (Purified Chick Embryo Cell) rabies vaccine in India.
In: VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.): Improvements in rabies post-exposure treatment, pp. 71-75, Zagreb Institute of Public Health, Zagreb
126. SEMPLE, D. (1911): The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine.
Scientific Memoranda of the Medical and Sanitation Department of India No. 44
127. SIKES, R.K., W.F. CLEARY, H. KOPROWSKI, T. WIKTOR, M.M. KAPLAN (1971): Effective protection of monkeys against death from street virus by post-exposure administration of tissue culture rabies vaccine.
Bull. W.H.O. 45, 1-11
128. SIMON, G. (1913): Über Lähmungen im Verlauf der Tollwutschutzimpfung.
Zbl. Bakt., Abt. I Orig. 68, 72-112
129. SMITH, J.S., P.A. YAGER, G.M. BAER (1973): A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody.
Bull. W.H.O. 48, 535-541
130. SMITH, J.S., C.L. McCLELLAND, F.L. REID, G.M. BAER (1982): Dual Role of the Immune Response in Street Rabiesvirus Infection of Mice.
Infect. Immun. 35, 213-221
131. SOKOL, F., E. KUWERT, T.J. WIKTOR, K. HUMMELER, H. KOPROWSKI (1968): Some properties of purified rabies virus virus preparations.
Bact. Proc. 68, 151
- 131a. SOKOL, F., E. KUWERT, T.J. WIKTOR, K. HUMMELER, H. KOPROWSKI (1968): Purification of Rabies Virus Grown in Tissue Culture.
J. Virol. 2, 836-849
132. SOKOL, F., D. STANCEK, H. KOPROWSKI (1971): Structural proteins of rabies virus.
J. Virol. 7, 241-249

133. SOULEBOT, J.P. (1973): Résultats sérologique de l'immunisation et de hyperimmunisation de l'homme avec une nouveau vaccin antirabique obtenu sur cultures de cellules diploids humaines WI-38.
In: La Rage, Colloque Paris, 1973, pp. 149-155, Expansion Scientifique Francaise, Paris
134. STECK, F. (1978): Epidemiologie der Tollwut.
Münch. med. Wschr. 120, 271-274
135. STEINBRECHER, H. (1978): Epidemiologie der Tollwut in der Bundesrepublik Deutschland.
Münch. med. Wschr. 120, 275-278
136. STEWART, W.E., S.E. SULKIN (1966): Interferon production in hamsters experimentally infected with rabies virus.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 123, 650-654
137. SUKRU-AKSEL, I. (1958): Pathologische Anatomie der Lyssa.
In: LUBARSCH, O., F. HENKE, R. RÖSSLE (Hrsg.): Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 13, Teil 2A, S. 417-435, Springer Verlag, Berlin
138. TAN, Y.H., J. TISCHFIELD, F.H. RUDDLE (1973): The linkage of genes for the human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21.
J. Exp. Med. 137, 317-330
139. TIMM, H., M. WOLTER (1970): Elektroencephalographische Untersuchungen im Verlaufe von Tollwut-schutzimpfungen nach Hempt.
Dtsch. med. Wschr. 95, 2108-2115
140. TSCHERSICH, A., F. BACKHAUSEN, R. ACKERMANN (1978): Klinische Darstellung eines Tollwutfalles.
Münch. med. Wschr. 120, 299-300

141. TURNER, G.S. (1978): Immunoglobulin (IgG) and (IgM) Antibody Response to Rabies Vaccine.
J. gen. Virol. 40, 595-604
142. VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.) (1985): Improvements in rabies post-exposure treatment. Proceedings of a meeting held in Dubrovnik, Yugoslavia, 30 May - 1 June, 1984.
Zagreb Institute of Public Health, Zagreb
143. WASI, C., P. CHAIPRASITHIKUL, P. PUTHAVATHANA, L. CHAVANICH, P. THONGCHAROEN (1985): Immunogenicity and reactogenicity of the new tissue culture rabies vaccine for human use (Purified Chick Embryo Cell Culture).
In: VODOPIJA, J., K.G. NICHOLSON, S. SMERDEL, U. BIJOK (Eds.): Improvements in rabies post-exposure treatment, pp. 85-94, Zagreb Institute of Public Health, Zagreb
144. WIKTOR, T.J., M.V. FERNANDES, H. KOPROWSKI (1964): Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI 38.
J. Immunol. 93, 353-366
145. WIKTOR, T.J., H. KOPROWSKI (1965): Successful immunization of primates with rabies vaccine prepared in human diploid cell strain WI-38.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 118, 1069-1073
146. WIKTOR, T.J., E. KUWERT, H. KOPROWSKI (1968): Immune lysis of rabies virus-infected cells.
J. Immun. 101, 1271-1282
147. WIKTOR, T.J., F. SOKOL, E. KUWERT, H. KOPROWSKI (1969): Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 131, 799-805

148. WIKTOR, T.J. (1971): New vaccines and the future of rabies prophylaxis.
In: Proceedings of the International Conference on the Applications of Vaccines Against Viral, Rickettsial, and Bacterial Diseases of Man, pp. 66-72, Panamerican Health Organization, Washington D.C.
149. WIKTOR, T.J., S.A. PLOTKIN, D. GRELLA (1973): Human cell culture rabies vaccine.
J. Amer. Med. Ass. 224, 1170-1171
150. WIKTOR, T.J., P.C. DOHERTY, H. KOPROWSKI (1977): In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 334-338
151. WIKTOR, T.J., R.I. MACFARLAN, K.J. REAGAN, B. DIETZSCHOLD, P.J. CURTIS, W.H. WUNNER, H.-P. KIENY, R. LATHE, J.-P. LECOCQ, H. HACKETT, B. MOSS, H. KOPROWSKI (1984): Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81, 7194-7198
152. WORLD HEALTH ORGANIZATION (Ed.) (1981): Requirements for Rabies Vaccine for Human Use.
WHO Techn. Rep. Ser. 658
153. WORLD HEALTH ORGANIZATION (Ed.) (1984): WHO Expert Committee on Rabies. Seventh Report.
WHO Techn. Rep. Ser. 709
154. YELVERTON, E. S. NORTON, J.F. OBIJESKI, D.V. GOEDDEL (1983): Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in Escherichia coli.
Science 219, 614-620
155. ZALAN, E., C. WILSON, D. PUKITIS (1979): A micro-test for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies.
J. Biol. Stand. 7, 213-220

156. ZINKE, G. (1804): Neue Ansichten der Hundswuth, ihrer Ursachen und Folgen, nebst einer sichern Behandlungsart der von tollen Thieren gebissenen Menschen.

Ch. E. Gabler, Jena

Ich danke Frau Dr. I. Marcus für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Herr Prof. Dr.Dr. E. Kuwert überließ mir das Thema dieser Arbeit und sorgte für meine freundliche Aufnahme durch seine Mitarbeiter am Institut für Medizinische Virologie und Immunologie, Universitätsklinikum Essen. Nach seinem plötzlichen Tod übernahm Herr Prof. Dr. N. Scheiermann die Betreuung meiner Arbeit. Ihm danke ich für die jederzeit gewährte Anleitung und Unterstützung.

Herrn Dr. J. Hilfenhaus, Forschungsabteilung Virologie der Behringwerke AG, Marburg, danke ich für die Durchführung der Interferonbestimmungen und die Überlassung der dabei erzielten Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr sage ich Dank für die Annahme dieser Arbeit und ihre Einreichung beim Promotionsausschuß der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Lebenslauf

Name : Jürgen Baer
geb. : 12.10.1958 in Bochum,
ev. getauft am 30.11.1958
Eltern : Wilhelm August Baer, Holzmeister, und
Gertrud Elisabeth Baer, geb. Otter

Schul-/Berufsausbildung:

1965 - 1968 Dietrich Bonhoeffer-Schule,
Bochum-Eppendorf
1968 - 1973 Städt. Jungengymnasium,
Bochum-Wattenscheid
1973 - 1975 Gymnasium Ettenheim/Baden
1975 - 1977 Pascal-Gymnasium, Münster/Westf.
Mai 1977 Abitur
1977 - 1982 Studium der Tiermedizin an der
Tierärztlichen Hochschule
Hannover
Nov. 1982 Staatsexamen

Approbation:

Jan. 1983

Bisherige Tätigkeit:

1983 - 1984 Tierärztl. Assistantentätigkeit
in der Praxis Dr. D. Jacobs,
Hohenlockstedt, Schleswig-Holstein
1984 - 1986 Doktorand am Institut für Med.
Virologie und Immunologie, Uni-
versitätsklinikum Essen

